

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação da sucessão ecológica de comunidades microbianas em
matéria orgânica vegetal em decomposição em manguezais do
Estado de São Paulo**

Marta Alves Moitinho

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Marta Alves Moitinho
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Avaliação da sucessão ecológica de comunidades microbianas em matéria orgânica vegetal em decomposição em manguezais do Estado de São Paulo
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO GOUVÊA TAKETANI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Moitinho, Marta Alves

Avaliação da sucessão ecológica de comunidades microbianas em matéria orgânica vegetal em decomposição em manguezais do Estado de São Paulo / Marta Alves Moitinho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Degradação foliar 2. Bactérias 3. Plantas de mangue I. Título

CDD 641.36
M715a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Ao ser de olhos pequenos e sempre marejados por dor de amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Rodrigo Gouvêa Taketani por todos os ensinamentos, amizade, paciência, paciência, paciência e acima de tudo paciência, durante esses dois anos de convivência.

Agradeço a minha mãe por todo amor e dedicação empregados a mim durante toda uma vida.

Agradeço imensamente e com o coração cheio de amor a minha família de São Paulo, que sempre foi imensamente acolhedora em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a Cleusa Maria Mantovanello Lucon por ser orientadora, mãe, conselheira, amiga e grande incentivadora.

Agradeço ao Dr. Itamar Soares de Melo por todo o apoio e por me conceder a oportunidade de desenvolver este trabalho na Embrapa.

A Laura Bononi agradeço por ser amiga, irmã, parceira de truco, companheira de cerveja, professora de excel, professora de power point e principalmente, por ser minha dupla nessa vida.

Agradeço a Vanessa Abdo por partilhar comigo momentos de felicidades, motivações e angústias.

Agradeço a Monica Aguiar (vulgo pedagoga) por ser minha alma gêmea intelectual, minha amiga e parceira nas conversas mais sem sentido dessa vida.

Agradeço a Carlos Alberto e Cleber Diniz por serem os melhores amigos desse mundo e de outros também.

Agradeço a Patrícia Haddad, Amanda, Rafael Vasconcellos, Bruno Evangelista e Danilo Tosta pelos diversos ensinamentos, conselhos, por me

proporcionarem o prazer de suas amizades, e principalmente, por me ajudarem em diversos momentos ao longo dessa árdua e divertida caminhada.

Aos amigos e companheiros de Embrapa agradeço pelos ensinamentos, conselhos e conversas divertidas regadas ao cheiro de café.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, ao prof. Dr. Fernando Dini Andreote e à secretária Maria Fernanda Prado, por todo o auxílio fornecido.

Ao CNPq agradeço o apoio financeiro que possibilitou a realização desse projeto.

E por fim agradeço a vida, ao universo e tudo mais, por sempre colocarem pessoas e oportunidades maravilhosas no meu caminho, sem as quais essa minha jornada seria bem mais difícil.

EPÍGRAFE

"O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Manguezais e sua importância	17
2.2 Vegetação de mangue	18
2.3 Solos dos manguezais	21
2.4 Micro-organismos nos manguezais	22
2.5 Bactérias em manguezais	23
2.6 Decomposição de material vegetal	24
2.7 Sucessão ecológica	25
2.8 Métodos moleculares para estudo de comunidades microbianas	26
2.9 Emissões de gases de efeito estufa (GEE) em manguezais	27
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	29
3.1 Hipótese	29
3.2 Objetivo Geral	29
3.3 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Descrição das áreas de coleta em Manguezais do Estado de São Paulo	31
4.2 Construção de Microcosmos para Avaliação de Sucessão Ecológica durante o processo de decomposição de material vegetal	32
4.3 Efeito de diferentes fontes de matéria orgânica vegetal sobre a emissão de gases de efeito estufa (GEE) em tratamentos em microcosmo	33
4.4 Extração de DNA da superfície das amostras de material vegetal	33
4.5 Amplificação e quantificação do DNA do domínio Bacteria das amostras de material vegetal por meio de PCR em tempo real	34
4.6 Amplificação do DNA das comunidades de bactérias presentes nas amostras de material vegetal por meio de PCR (polymerase chain reaction)	34
4.7 Quantificação e purificação do produto de PCR	35
4.8 Avaliação da Dinâmica da Comunidade Microbiana por Sequenciamento em Larga Escala	35
4.9 Análise das sequências obtidas por meio de sequenciamento em larga escala	36
4.10 Análises estatísticas	37

5 RESULTADOS	39
5.1 Análise de massa de matéria seca (MMS) dos discos de material vegetal.....	39
5.2 Análises das emissões de gases de efeito estufa (GGE) em tratamentos em microcosmos.....	40
5.2.1 Quantificação das emissões de N ₂ O	40
5.2.2 Quantificação das emissões de CO ₂	42
5.2.3 Quantificação das emissões de CH ₄	43
5.3 Quantificação de <i>rrs</i> (16S rRNA) por cm ² de massa foliar dos discos de matéria vegetal por qPCR (PCR em tempo real).....	45
5.4 Estrutura das comunidades microbianas durante decomposição de material vegetal.....	47
5.4.1 Diversidade alfa (α) das comunidades de bactéria presentes nas amostras....	48
5.4.2 Frequência relativa das sequências ribossomais das classes mais abundantes... ..	49
5.4.3 Diversidade beta (β).....	51
5.4.4 PERMANOVA	54
6 DISCUSSÃO.....	55
6.1 Análise da massa de matéria seca (MMS) dos discos de material vegetal.....	55
6.2 Análises das emissões de gases de efeito estufa (GEE) em tratamentos em microcosmos.....	56
6.3 Quantificação de <i>rrs</i> (16S rRNA) por cm ² de massa foliar dos discos de matéria vegetal por qPCR (PCR em tempo real).....	57
6.4 Diversidade alfa (α) das comunidades de bactéria presentes nas amostras	58
6.5 Frequência relativa das sequências ribossomais das classes mais abundantes	60
7 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Avaliação da sucessão ecológica de comunidades microbianas em matéria orgânica vegetal em decomposição em manguezais do Estado de São Paulo

Manguezais são ecossistemas que se distribuem ao redor do globo e desempenham funções ecológicas que são fundamentais para os ambientes costeiros adjacentes. Além de fornecerem uma ampla variedade de organismos para o subsídio humano, são áreas de produção e exportação de matéria orgânica, e também fornecem abrigo, alimentação e local para a reprodução de diversos animais marinhos. Apesar de sua enorme importância, esse ambiente encontra-se fortemente ameaçado e sob risco de desaparecer. As árvores de mangue são o seu componente mais básico e visível, sendo consideradas bastante produtivas, com grande parte do carbono orgânico encontrado nesse ambiente sendo proveniente da liteira e raízes das plantas. Micro-organismos são extremamente diversos, dinâmicos e estão distribuídos por todo o planeta, desempenhando importantes funções ecológicas, e dentro dos manguezais, eles são responsáveis pela maioria das transformações de nutrientes. Diversos estudos apontam a importância da comunidade bacteriana para uma equilibrada manutenção dos processos que ocorrem nesse ambiente, sendo um destes a decomposição de serapilheira. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica da comunidade bacteriana durante o processo de degradação de material vegetal em sedimentos de manguezais do Estado de São Paulo. Para isso, foi realizado o sequenciamento em larga escala do gene rRNA 16S do domínio Bacteria presente sobre a superfície do material vegetal. Paralelamente a isto, foi feita a quantificação da emissão CO₂, N₂O e CH₄, durante os diferentes estádios de degradação foliar e também a análise da dinâmica e estrutura das comunidades. Os resultados obtidos por meio de sequenciamento em larga escala do gene rRNA 16S apontam o filo Proteobacteria como o grupo dominante nos três manguezais estudados, independente da espécie de planta. A classe Gammaproteobacteria apresentou uma maior abundância nos estádios iniciais de decomposição do material vegetal (7 e 15 dias), sofrendo um decaimento bem acentuado nas fases mais avançadas (60 dias). A alfa diversidade sofreu um aumento ao longo do tempo, com todas as amostras exibindo valores maiores nos estádios finais do processo de decomposição foliar. Em relação à emissão de gases de efeito estufa (GEE) em tratamentos em microcosmo, para N₂O e CO₂ tempo e local foram significativamente importantes. Já para CH₄ somente o local foi relevante nas taxas de emissão. Foi possível identificar grupos de bactérias predominantes nas fases de decomposição foliar ao longo do período estudado. Gammaproteobacteria foi uma classe que se apresentou em maior quantidade nos estádios iniciais (7 e 15 dias), enquanto Alphaproteobacteria foi um grupo mais expressivo nas fases mais avançadas de degradação (30 e 60 dias).

Palavras-chave: Degradação foliar; Bactérias; Plantas de mangue

ABSTRACT

Evaluation of ecological succession of microbial communities in organic matter decomposition in mangrove plant in the State of São Paulo

Mangroves are ecosystems that are distributed around the globe and perform ecological functions that are critical to the adjacent coastal environments. In addition to providing a wide variety of organisms for human activities, they have high productivity and are known as areas of production and export of organic matter, and also provide shelter, food and location for reproduction of various marine animals. Despite its enormous importance, this environment is at risk of disappearing. Mangrove trees are its most basic and visible component, being considered quite productive, with most of the organic carbon found in this environment being from the litter and plant roots. Micro-organisms are extremely diverse, dynamic and are spread across the globe, contributing with important environmental roles, and within the mangroves, they are responsible for most of nutrient transformations. Several studies point to the importance of the bacterial community for the balanced maintenance of the processes that are occurring in this environment. One of the most crucial of them is the decomposition of leaf-litter. Thus, this study aimed to evaluate the dynamics of bacterial communities during the degradation of plant material on sediments of São Paulo State mangroves by high throughput sequencing of 16S rRNA gene of Bacteria present on the surface of the plant material. In parallel, we quantified the emissions of CO₂, N₂O and CH₄ during the different stages of leaf degradation and also the analysis of the dynamics and structure of communities. The results obtained by the sequencing of the 16S rRNA gene indicate the phylum Proteobacteria as the dominant group in the three mangroves, regardless of plant species. The Gammaproteobacteria class showed a greater abundance in the early stages of decomposition of the plant material (7 and 15 days), suffering a very sharp decay in the later stages (60 days). Alpha diversity has increased over time, with all the samples showing higher values in the final stages of the leaf decomposition process. It was possible to identify groups of bacteria predominant in the stages of decomposition of plant material throughout the study period. Regarding greenhouse gas emissions (GHG) in treatments in microcosm, time and location were significantly important factors to N₂O and CO₂ emissions. As for CH₄ only the site was relevant in emission rates. It was possible to identify groups of bacteria predominant in the stages of leaf decomposition during the studied period. Gammaproteobacteria was a class that contains the main amount in the early stages (7 and 15 days), while Alphaproteobacteria was a more significant group in the most advanced stages of degradation (30 and 60 days).

Keywords: Leaf degradation; Bacteria; Mangrove plants

1 INTRODUÇÃO

Manguezais são ecossistemas que dominam regiões litorâneas, sendo que sua distribuição se dá por todo o globo em áreas tropicais e subtropicais. São diversos os benefícios que os manguezais conferem as regiões costeiras, dentre elas: proteção contra erosão causada pela ação das ondas, retenção de metais pesados, área de alta produção de matéria orgânica com consequente exportação da mesma para as águas costeiras adjacentes, e principalmente, área de reprodução, abrigo e alimentação de diferentes animais marinhos. Esse ecossistema também beneficia diretamente o ser humano, pois ao longo dos anos, permitiu a subsistência de diversas comunidades que habitam o seu entorno através do fornecimento de diferentes organismos para o seu subsídio.

Micro-organismos são extremamente diversos e estão amplamente distribuídos por todos os ambientes ao redor do planeta e comunidades microbianas estão sempre desempenhando funções que são de fundamental importância para a manutenção da vida na terra. Em manguezais, micro-organismos são responsáveis pela degradação de matéria orgânica, pela transformação e disponibilização de diferentes nutrientes que podem ser utilizados pelas plantas, e pela grande produção primária que é observada nesses locais. Uma das etapas mais importantes na ciclagem de nutrientes dentro de qualquer ambiente é a decomposição de serapilheira, e fungos e bactérias são os principais agentes na execução desse processo.

Comunidades microbianas são extremamente dinâmicas, sofrendo diversas alterações ao longo do tempo e espaço, e essas mudanças podem resultar em crescimento de algumas populações e desaparecimento de outras, conferindo a essas comunidades dinamismo e transformações que podem ser observadas em sua estrutura. Nos últimos anos tem ocorrido um grande avanço nos métodos moleculares para análise de comunidades microbianas. Muitos organismos que ainda não podem ser cultivados em laboratório tiveram os seus estudos possibilitados devido ao progresso alcançado pelas metodologias independentes de cultivo.

Dessa forma, este trabalho descreve a diversidade de bactérias associadas com o processo de degradação de material vegetal em manguezais do estado de São Paulo, pelo método de sequenciamento em larga escala. Vislumbrando assim a

sucessão ecológica que ocorre dentro dessas comunidades ao longo de um período de tempo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Manguezais e sua importância

O ecossistema manguezal se desenvolve em regiões litorâneas, em condições tropicais e subtropicais ao redor do globo, situando-se em locais onde ocorra a transição entre os ambientes marinho, terrestre e de água doce. Um aspecto fundamental deste ambiente é que ele se encontra sob a constante influência das marés. No Brasil, os manguezais ocorrem por quase toda a extensão da orla marítima de forma quase contínua, dependendo das condições fisiológicas do ambiente. Começam no extremo Norte (Oiapoque) e se estendem até Santa Catarina (Laguna) (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

As marés são extremamente importantes para a conformação deste ecossistema, pois é pela ação destas, que sedimentos e detritos provindos de rios e do mar, são carreados para dentro dos manguezais, fazendo com que ocorra assim, a aquisição de novas áreas. Em geral, manguezais se desenvolvem bem em regiões que possuam uma topografia adequada, que estejam ao alcance das marés, que recebam alto aporte de água dos rios e das chuvas, como também de nutrientes e sedimentos. Todos estes fatores combinados podem levar os manguezais a alcançar seu máximo desenvolvimento (VANUCCI, 1999; SCHAEFFER-NOVELLI et al.; 1990).

É um ecossistema que está associado ao bioma Mata Atlântica e aos recursos hídricos, além de ser apontado como um dos indicadores ecológicos mais significativos na zona costeira. É reconhecido por desempenhar diversas importantes funções, dentre as quais se destacam as seguintes: proteção da linha de costeira; barreira mecânica à ação erosiva das ondas e marés; retenção de sedimentos carreados pelos rios, retenção de metais pesados; área de concentração de nutrientes e matéria orgânica; área de renovação da biomassa costeira; estabilizador climático e principalmente, área de reprodução, de abrigo e de alimentação de inúmeras espécies, o que o caracteriza como um verdadeiro berçário do mar (ALVES, 2001).

Para o ser humano o manguezal também é imensamente relevante, pois este ecossistema fornece uma ampla variedade de organismos para o seu subsídio, tais como, moluscos, crustáceos e peixes. A utilização destes animais, seja para a comercialização ou consumo próprio, permitiu ao longo dos anos a sobrevivência de

inúmeras comunidades na zona costeira e a manutenção de uma tradição e cultura próprias da região (ALVES, 2001).

No que diz respeito à circulação de energia e matéria, manguezais são considerados ecossistemas abertos. O transporte de material orgânico para dentro desse ecossistema, sua ciclagem, e consequente exportação para ambientes adjacentes são controlados por fatores físicos e biológicos, tais como marés, escoamentos, chuvas, queda das folhas, decomposição de material vegetal, atividade da fauna, dentre outros (NASCIMENTO, 1988; VANUCCI, 1999).

Por estarem diariamente expostos à ação das marés, ocorre uma exportação de material particulado como folhas, galhos e propágulos, que serão decompostos nos corpos d'água adjacentes. Nas porções mais internas do manguezal a serapilheira acaba sendo decomposta nos limites do próprio ambiente, gerando assim, a formação de matéria orgânica dissolvida, que é considerada de alto valor ecológico (SCHAEFFER-NOVELLI, 2002). Esses detritos servem como base em uma extensiva cadeia alimentícia, no qual organismos de importância comercial fazem parte. O desflorestamento de comunidades de manguezais é um dos principais fatores que influenciam a diminuição da pesca costeira de muitos países tropicais e subtropicais. Além disso, esse ambiente fornece abrigo, refugio e zonas de reprodução para diversos organismos marinhos (HOLGUIN et. al., 2001).

Segundo Pannier e Pannier (1990) manguezal é um sistema ecológico que representa uma unidade integrada, abrigando componentes vegetais e animais altamente adaptados às condições características desse ambiente, tais como: solos periodicamente inundados pela ação das marés, variação de salinidade e um clima bem homogêneo.

2.2 Vegetação de mangue

As árvores de mangue são o componente mais básico e visível do ecossistema manguezal. O termo mangue é utilizado para se referir ao conjunto de árvores tropicais e arbustos, que crescem na zona entre marés. A ação das marés sobre os manguezais confere um dinamismo bem peculiar às regiões onde estes estão situados, produzindo uma constante modificação na topografia desses terrenos, o que resulta em uma série de avanços e recuos da cobertura vegetal (SCHAEFFER-NOVELLI, 1990).

Nas florestas de mangue brasileiras são encontradas poucas espécies vegetais, sendo estas: *Rhizophora mangle*, *Rhizophora racemosa*, *Rhizophora harrisonii*, *Avicennia germinans*, *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Conocarpos erecta*. Já nos manguezais da costa sul e sudeste, a vegetação é constituída pelos gêneros (*Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia*) e quatro espécies: *R. mangle*, *A. schaueriana*, *A. germinans* e *L. racemosa* (SCHAEFFER-NOVELLI, 1990).

A vegetação de mangue encontrada na região da baixada Santista é considerada homogênea, pois é constituída de uma formação lenhosa em praias argilo-lodosas, dentro da zona das marés. Difere ecologicamente e florísticamente da vegetação de terra firme, sendo composta basicamente pelas árvores do gênero: *Rhizophora mangle*, que possuem raízes que partem diretamente do tronco e do caule, promovendo a sustentação e a troca de oxigênio com a atmosfera. *Laguncularia racemosa*, que apresenta um menor porte quando comparada às outras duas espécies, apresentando pneumatóforos, porém de formatos menores, bifurcados ou trifurcados e *Avicennia schaueriana*, que produz frutos com uma capsula oval e achatada e possui um sistema radicular cheio de pneumatóforos, que garantem a propagação e a sobrevivência da espécie (LAMBERTI, 1966).

A vegetação de mangue não é tolerante a baixas temperaturas e a sua distribuição e desenvolvimento dependem que as temperaturas da água e do mar apresentem condições adequadas. Quando o ambiente é extremamente favorável ao desenvolvimento do ecossistema manguezal, as florestas de mangue podem alcançar um valor de biomassa que pode ser comparado com valores encontrados em florestas tropicais (ALONGUI, 2009).

A salinidade não é considerada um fator requerente ou limitante ao crescimento das plantas, pois em sua maioria, as espécies apresentam um crescimento ótimo quando sujeitas a uma baixa salinidade. No entanto, a salinidade é um fator importante para que essas espécies se sobressaiam na competição com as demais plantas vasculares, que não estão adaptadas a suportar um ambiente salino (FELLER; SITNIK, 1996; PASCOALINI et al., 2014).

Essa tolerância a diferentes níveis de salinidade ocorre por meio de diversos mecanismos fisiológicos e morfológicos, que segundo Vanucci (1999), podem ser resumidos em três principais categorias: 1) barreira à penetração do cloreto de sódio e outros sais pelas raízes; 2) secreção do excesso de sais através de glândulas

especializadas, geralmente ocorrendo ao nível de folhas e 3) acúmulo e imobilização de sais em diferentes tecidos.

O frequente estado de inundação do sedimento dos manguezais, acarretado pela dinâmica ação das marés, confere outro aspecto estressante as plantas. Essa particularidade gera um substrato pobre em oxigênio, salino e instável, exigindo assim, que as plantas possuam um sistema radicular especializado e adaptado para prosperar sob essas condições. Dessa forma, além de propiciar a fixação da planta no sedimento, o sistema radicular também é responsável por realizar trocas gasosas (FELLER; SITNIK, 1996).

Esse sistema radicular altamente adaptado é composto por raízes aéreas que brotam dos galhos em direção ao solo, raízes escoras que saem dos troncos, ancorando a planta no sedimento e pneumatóforos, que ajudam a planta a realizar trocas gasosas. Essas raízes geralmente estão envoltas em um tecido esponjoso denominado aerênquima, que facilita a troca de gases para o tecido interno, há também lenticelas nos troncos e pneumatóforos com a mesma função (VANUCCI, 1999).

Outra adaptação presente na vegetação de mangue é a reprodução por viviparidade, esta é observada na maioria das espécies. A germinação da semente ocorre enquanto ela ainda está ligada a planta mãe, gerando assim, propágulos que acumulam altas reservas nutritivas. Quando esses propágulos se desprendem, eles são capazes de percorrer grandes extensões, até alcançarem um local adequado para a sua fixação (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Apesar de serem amplamente descritos como ambientes ricos em matéria orgânica, muitos manguezais em diversas localizações ao redor do globo, apresentam uma reduzida disponibilidade de nutrientes, principalmente com relação a nitrogênio e fósforo, sendo estes os macroelementos de maior limitação ao crescimento vegetal (SENGUPTA; CHAUDHURI, 1991; HOLGUIN et al., 1992; ALONGI et al., 1993; VAZQUEZ et al., 2000). Juntamente com esse aspecto, a taxa de decomposição e a retenção de nutrientes no sedimento, podem reduzir a disponibilidade destes para a absorção pelas plantas (NAIDOO, 2006).

O termo manguezal é geralmente utilizado para descrever ambos as árvores e a comunidade. Esta última é composta por uma ampla variedade de organismos pertencente a diferentes grupos, tais como: fungos, bactérias, microalgas, invertebrados, pássaros e mamíferos (HONGUIN et al., 2001).

Manguezais são principalmente encontrados próximos a áreas urbanas, sob o constante impacto de atividades antropogênicas, e a contínua expansão dessas áreas resulta em severos impactos nos manguezais, acarretando em modificações na sua hidrologia, sedimento e na dinâmica de nutrientes (LEE et al., 2006).

2.3 Solos dos manguezais

Os solos de mangue são formados pela deposição de partículas de origem terrestre e marinha, orgânicas e inorgânicas, que estão em suspensão na água, e se movimentam por meio do fluxo e refluxo das marés. O encontro das águas doces e salgadas na região estuarina faz com que os sedimentos transportados percam velocidade e se unam através de processos físico-químicos formando grumos (processo de floculação). Essa formação dos grumos implica em aumento do peso das partículas, estas que vão para o fundo, formando um sedimento fino, composto basicamente por silte, argila e matéria orgânica, propiciando assim, a instalação de espécies vegetais. Esse sedimento majoritariamente anaeróbico, exceto nas suas porções superficiais (ALVES, 2001; HONGUIN, 2001; VANUCCI, 1999; STRALHER; STRALHER, 2000).

Em função do alagamento, a taxa de difusão do oxigênio é reduzida, não suprimindo a demanda microbiana para oxidação da matéria orgânica. A decomposição passa então a ocorrer pelo metabolismo de organismos anaeróbios, que utilizam receptores de elétrons alternativos ao O_2 , seguindo a seguinte sequência termodinâmica: NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , CO_2 (metanogênese), N_2 e H^+ (SCHULZ, 2000).

Os solos de manguezais geralmente requerem uma série de processos biológicos complexos que são viabilizados pela ação de diferentes micro-organismos tais como bactérias, cianofíceas, diatomáceas e algas verdes. Esses organismos captam, transformam e liberam nutrientes que serão utilizados pelas plantas da vegetação de mangue (NASCIMENTO, 1998).

As perturbações causadas pela poluição dos sedimentos, geralmente acarretam em mudanças na composição e crescimento da microbiota, podendo levar a uma perda de nutrientes e também a uma possível liberação de subprodutos microbianos que muitas vezes podem ser tão tóxicos quanto o contaminante inicial (ALONGI, 1994).

Por isso a exploração florestal desse ambiente deve ser realizada com imensa cautela e preocupação, pois diversos fatores devem ser considerados para que esse ecossistema e toda a diversidade microbiológica que ele abriga, não sejam afetados negativamente, trazendo danos irreversíveis para o mesmo (GOMES, 2002).

2.4 Micro-organismos nos manguezais

A diversidade microbiana nos manguezais é responsável pela maioria das transformações de nutrientes dentro desse ecossistema. Bactérias e fungos constituem 91% da massa microbiana, enquanto que algas e protozoários representam apenas 7% e 2% respectivamente (ALONGI et al., 1993; HOLGUIN et al., 1999; ALONGI, 1988).

A degradação do material vegetal em manguezais produzem detritos que podem ser definidos como matéria orgânica em ativo processo de decomposição. Esse detrito é rico em energia e contém uma grande comunidade microbiana que participa ativamente do processo de decomposição. Redução de sulfato, produção de metano e desnitrificação são importantes processos que ocorrem durante a decomposição de matéria orgânica em ambientes anóxicos (ODUM; HEALD, 1975; BANO et al., 1997; HOLGUIN et al., 2001).

As folhas das plantas de mangue são compostas principalmente de lignocelulose, macromoléculas que são degradadas pelos micro-organismos presentes nesse ambiente. A degradação da folha se inicia assim que esta chega ao sedimento e esse processo pode durar até 6 meses, ou ainda mais tempo para casos de degradação de madeira (ALONGI et al., 1989; MORAN; HODSON, 1989; NEWELL et al., 1984; STEINKE et al., 1990).

Pesquisas realizadas com comunidades microbianas em manguezais concluem que existe uma relação muito íntima entre micro-organismos, nutrientes e plantas, estes que funcionam como um sistema unificado, com a função de reciclar e conservar nutrientes dentro desse ambiente (DIAS, 2010).

Comunidades microbianas presentes em manguezais são descritas como altamente produtivas e diversas, e elas se encontram continuamente degradando matéria orgânica e disponibilizando nutrientes como: nitrogênio e fósforo, que podem ser utilizados pelas plantas. Em contrapartida, a vegetação libera uma gama de

exsudatos que servem como fonte nutritiva para essas comunidades (HONGUIN et al., 2001).

Essas diversas comunidades microbianas presentes em manguezais estão constantemente se adaptando as flutuações ambientais que ocorrem dentro desse habitat, tais como flutuação da salinidade e intermitente estado de inundação do substrato. Mas devido a sua abundante oferta de carbono e outros nutrientes, esses ecossistemas abrigam um considerável número de populações de micro-organismos (THATOI et al., 2012). Estudos de diversidade e estruturação dessas comunidades se fazem necessários, pois novos resultados ajudam a agregar e expandir os conhecimentos que foram obtidos por meio dos trabalhos pioneiros, possibilitando assim, uma melhor compreensão da complexidade que são esses ambientes denominados manguezais.

2.5 Bactérias em manguezais

Diversos estudos apontam a importância da comunidade bacteriana para uma equilibrada manutenção dos processos que ocorrem em manguezais. Esses organismos ocupam uma grande variedade de nichos e são encontrados em maior número do que fungos, algas e protozoários. As bactérias são as principais participantes nos ciclos do carbono, enxofre, nitrogênio e fósforo em florestas de mangue (HOLGUIN et al., 2001; TOLEDO et al., 1995; ROJAS et al., 2001; DAS et al., 2012).

Thatoi et al. (2012) relatam que os principais grupos de bactérias encontrados em manguezais são: bactérias redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* sp., etc.); bactérias fixadoras de nitrogênio (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Klebsiella* sp., etc.); bactérias solubilizadoras de fosfato (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Xanthobacter*, *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Chryseomonas* and *Pseudomonas* sp., etc); fotossintéticas anoxigênicas (*Chloronema*, *Chromatium*, *Beggiatoa*, *Thiopedia*, *Leucothiobacteria* sp., etc.) e bactérias metanogênicas (*Methanococcus methylutens* sp., etc).

Muitas dessas bactérias são extremamente importantes na manutenção da natureza química dos sedimentos de manguezais, e dentro da fração anaeróbica, um importante grupo é o das bactérias redutoras de sulfato. Esse grupo é decompositor primário de resíduos orgânicos que são de fundamental importância

para o ciclo do carbono. Bactérias também desempenham importante papel no ciclo do nitrogênio, e estão envolvidas em todas as fases da transformação desse nutriente, como fixação, amonificação, nitrificação e desnitrificação (ABRAHAM et al., 2004; GHIZELINI et al., 2012).

Os principais produtos gerados com a reciclagem da matéria orgânica são detritos ricos em proteínas e enzimas, estes que abrigam uma grande população microbiana. Diversos trabalhos reportam uma relação de interdependência entre bactérias e espécies vegetais de manguezais. As plantas atuam ativamente na liberação de nutrientes na forma de exsudatos, estes que por sua vez, podem ser utilizados pela comunidade de bactérias presente tanto na rizosfera, como no sedimento (ALONGI et al., 1993; NEDWELL et al., 1994).

Holguin et al. (2007) listaram três mecanismos pelos quais comunidades bacterianas podem ajudar a sustentar as espécies de mangue: Primeiro por meio da mineralização da matéria orgânica em condições anaeróbias e principalmente microaerófilas, este processo está relacionado diretamente com a intervenção de bactérias redutoras de sulfato. Segundo, através de taxas significativas de fixação biológica que contribuem entre 40 a 60% com os requisitos de nitrogênio desse ecossistema. E terceiro, com a presença de bactérias da rizosfera, estas que podem fornecer a vegetação diferentes nutrientes e outras substâncias, tais como as que são reguladoras de crescimento de plantas.

2.6 Decomposição de material vegetal

Uma das etapas mais importantes da ciclagem de nutrientes em qualquer ambiente é a decomposição da serapilheira. Esse processo possibilita que parte do carbono incorporado na biomassa pela fotossíntese retorne à atmosfera como CO₂ e outros elementos, passando para uma forma novamente assimilável pelas plantas. Após sua queda, a serapilheira pode ser decomposta na superfície do solo e esse processo é principalmente regulado pelos seguintes fatores: natureza da comunidade decompositora (os macro e micro-organismos), características do material orgânico que determinam sua degradabilidade e as condições físico-químicas do ambiente (CORREIA; ANDRADE, 1999; OLIVEIRA, 2010).

A velocidade de decomposição das folhas das plantas de mangue é bastante variável e pode depender do local onde elas se precipitam, do local para onde

poderão ser transportadas, da natureza e idade do material foliar, bem como da espécie de planta (ADAIME, 1985).

A decomposição ocorre por meio da fragmentação mecânica, seguida de colonização ou utilização direta de matéria orgânica particulada ou dissolvida, por micro-organismos. Desta forma, o processo de decomposição envolve basicamente duas etapas: perda de peso rápida, comandada por processos físico-químicos e causada por lixiviação; e perda de peso lenta, resultante da ação de processos biológicos que envolvem fragmentação mecânica e degradação de compostos estruturais por fungos e bactérias (POLUNIN, 1982).

2.7 Sucessão ecológica

Sucessões ecológicas podem ser definidas como uma forma previsível e ordenada, onde comunidades mudam ao longo de um tempo, seguindo-se a colonização de um determinado ambiente. Estudos nessa área tem sido de grande importância para o desenvolvimento de teorias ecológicas ao longo dos séculos (FIERER et al., 2010).

Todos os sistemas biológicos são dinâmicos em uma ou mais escalas. Esse dinamismo se refere principalmente as mudanças ao longo do tempo, e mudanças temporais em comunidades microbianas resultam em crescimento e desaparecimento de determinadas populações, assim como a predominância de determinados grupos em detrimento de outros (FUHRMAN et al., 2015).

Uma comunidade microbiana encontra-se sob constante processo de mudança, principalmente ao longo de uma escala temporal, isso acontece principalmente, em resposta as diferentes forças exercidas pelo ambiente, incluindo fatores bióticos e abióticos. A influência desses fatores sobre uma comunidade pode acarretar em mudanças na sua estrutura (FUHRMAN et al., 2015).

Respostas fisiológicas de micro-organismos as mudanças ambientais podem ocorrer rapidamente, essas respostas rápidas podem ser observadas em comunidades que comportam grupos com crescimento relativamente acelerado. Geralmente os organismos que se enquadram nessa classificação são os das classes: Gammaproteobacteria, Flavobacteriia, Alphaproteobacteria e outros (FUHRMAN; HAGSTRÖM, 2010).

Comunidades microbianas são extremamente complexas e diversas, e a composição de uma comunidade pode mudar consideravelmente quando estudadas

ao longo de um período de tempo. Porém a grande totalidade de grupos microbianos, ainda não é passível de ser acessada através de métodos dependentes de cultivo. Porém, com recentes avanços em análises moleculares, diversos estudos sobre diversidade microbiana e seus padrões de sucessão ecológica vêm sendo desenvolvidos com relativa facilidade, ajudando assim, ecologistas do mundo todo a obterem progresso e avançarem nesse campo de pesquisa (FIERER et al., 2010).

2.8 Métodos moleculares para estudo de comunidades microbianas

Em estudos para avaliar os micro-organismos em determinados ambientes, podem ser utilizados métodos de isolamento aplicando técnicas que sejam dependentes de cultivo, ou não. Ao utilizar-se de técnicas dependentes de cultivo, diversos micro-organismos que não são cultiváveis, tem seu estudo impossibilitado, gerando assim, uma restrição ao estudo de grupos já conhecidos. Ao longo dos últimos anos, técnicas moleculares vêm sendo empregadas para que as comunidades microbianas sejam analisadas através de moléculas biológicas extraídas diretamente de amostras ambientais (DIAS, 2010).

Estudos moleculares possibilitaram grandes avanços em determinar quais organismos estão presentes em determinado ambiente, e como estes estão distribuídos ao longo de tempo e espaço. A maioria dessas informações é extraída de análises filogenéticas, que na maioria das vezes são obtidas pela análise de genes informativos, tais como 16S e 18S rRNA (PACE et al., 1986; CAPORASO, 2012).

Comunidades microbianas são extremamente diversas e até o momento a maioria dos organismos que habitam ambientes naturais ainda não foi cultivada em laboratório. O atual desafio da ecologia microbiana é entender quem está em determinado ambiente, interagindo com quem, o que estão fazendo, o porquê de desempenharem essa função e quando isso ocorre. Para responder essas questões de uma forma válida é necessário se obter informação sobre determinada comunidade englobando a sua totalidade, considerando a sua dinâmica sob o aspecto temporal (ZHOU et al., 2015).

Com o rápido avanço obtido com as técnicas de sequenciamento de nova geração, juntamente com as ferramentas computacionais necessárias para a análise desses dados, se presume que em um futuro não muito distante, microbiologistas

serão capazes de modelar e prever o funcionamento de uma comunidade microbiana de forma extremamente eficaz. Diversos cientistas apostam que uma nova era da ecologia microbiologia está chegando (ZHOU et al., 2015; ZHOU, 2009).

2.9 Emissões de Gases de efeito estufa (GEE) em manguezais

A produção e emissão de gases de efeito estufa têm crescido continuamente desde a era pré-industrial e vem causando o problema do aquecimento global. As emissões de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O) oriundos das áreas costeiras úmidas, dentre elas os manguezais, são importantes gases de efeito estufa (GEE) para a atmosfera, e podem contribuir de forma significativa com esse problema (CHEN et al., 2011).

A produção dos GEE nos solos dos manguezais se refere principalmente à atividade microbiana durante a degradação da matéria orgânica e à respiração radicular. A emissão de CO₂ é maior quando os solos estão aerados, em épocas de marés baixas, ou épocas de seca (CHEN et al., 2011).

Por se localizarem em regiões entre marés, manguezais estão constantemente inundados, o que torna os solos reduzidos, anaeróbicos e ricos em matéria orgânica. E sob essas condições, desnitrificação e metanogênese são processos envolvidos na renovação dos nutrientes. Sendo assim, o potencial de emissão desses gases por manguezais, não deve ser ignorado (KRITHIKA et al., 2008).

3 Hipótese e Objetivos

3.1 Hipótese

Comunidades microbianas são dinâmicas, e esse dinamismo pode ser acompanhado ao longo de um processo ou de um período de tempo resultando em mudanças que podem refletir na estruturação dessas comunidades. Portanto a hipótese desse trabalho é de que a distribuição dos grupos de bactérias durante o processo de decomposição foliar tendem a mudar conforme o avanço da degradação, em três manguezais do Estado de São Paulo os quais possuem características distintas.

3.2 Objetivo Geral

Descrever a diversidade de bactérias associadas com o processo de degradação de material vegetal em três manguezais do Estado de São Paulo.

3.3 Objetivos específicos

Estudar a diversidade de bactérias durante os diferentes estádios de decomposição de material vegetal.

Quantificar a emissão de gases de efeito estufa (GEE) durante as diferentes fases de decomposição do material vegetal.

Avaliação da degradação do material foliar por meio da quantificação de massa de matéria seca (MMS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição das áreas de coleta em manguezais do Estado de São Paulo

No presente trabalho foram avaliadas as comunidades microbianas presentes em três manguezais localizados no Estado de São Paulo, sendo dois no município de Bertioga e um no município de Cananéia. Estes manguezais apresentam características diferentes, sendo que em Bertioga um manguezal está em estado natural, enquanto que o outro sofreu impacto causado por derramamento de petróleo na década de oitenta, e a mata nativa apresenta-se ainda em regeneração. O manguezal localizado na cidade de Cananéia encontra-se situado em área de reserva ambiental, tendo como fator externo de impacto apenas um baixo efeito antrópico.

As coletas necessárias para realização dos experimentos foram feitas nos manguezais de Bertioga, Bertioga Contaminado e Cananéia (Figura 1). Coletou-se folhas das espécies vegetais *Rhizophora mangle*, *Laguncularia recemosa* e *Avicennia schaueriana*, juntamente com sedimento e água.

Tabela 1 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no estado de São Paulo (DIAS, 2012)

	<i>Bertioga Contaminado</i>	<i>Bertioga</i>	<i>Cananéia</i>
<i>Latitude</i>	23° 53' 74" S	23° 54' 08" S	25° 05' 03" S
<i>Longitude</i>	46° 12' 50" W	46° 15' 06" W	47° 57' 75" W

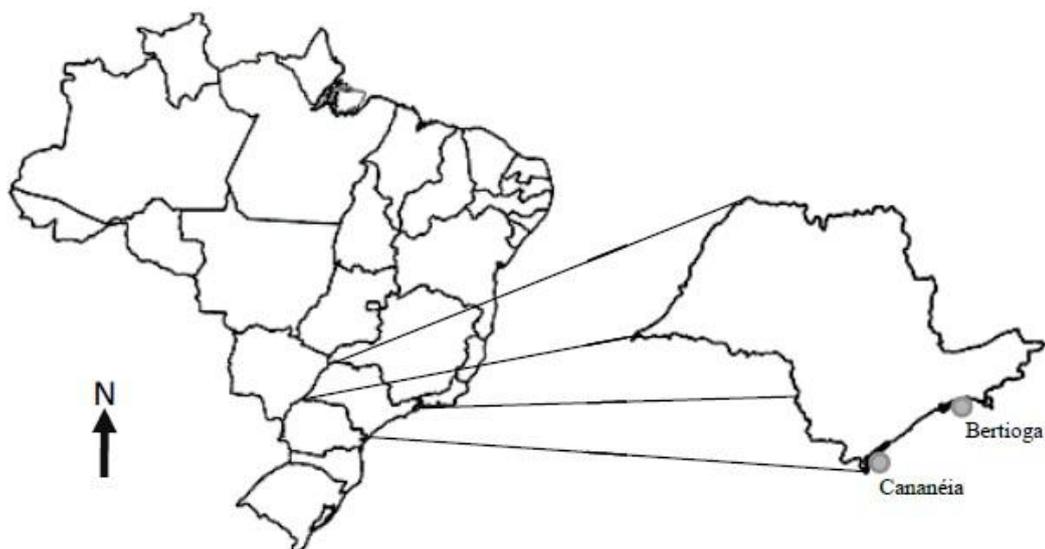


Figura 1 - Sítios de coleta do projeto. Pontos de coleta estão marcados com bola

Tabela 2 - Análises Físico-químicas das amostras de sedimento coletadas (DIAS, 2012).

Análise	Bertioga contaminado	Bertioga	Cananéia
Composição Física			
argila:silte:argila (%)	34:60:6	71:24:05	22:26:52
Umidade	65,16	73,97	69,9
Condutividade (mS)	8,98	9,42	14,72
Dados Químicos			
pH	6,9	7,1	5,9
matéria orgânica (%)	10,86	10,28	7,54
nitrogênio (N) (%)	0,13	0,29	0,72
fósforo (P) (%)	0,13	0,07	0,07
potássio (K) (%)	0,09	0,08	0,14
cálcio (Ca) (%)	0,27	0,24	0,15
magnésio (Mg) (%)	0,2	0,19	0,19
enxofre (S) (%)	0,31	0,24	0,23
sódio (Na) (mg/kg)	5,327	4,77	7,35

Tabela 3 - Análise da composição química das folhas das três plantas: *Rhizophora mangle* (R), *Laguncularia recemosa* (L) e *Avicennia schaueriana* (A), presente nos manguezais de Bertioga (B), Bertioga com Contaminação (BC) e Cananéia (C). PB* (proteínas).

Amostra	Hemicelulose *	Celulose *	Lignina *	PB *
AB	179,87	161,10	241,24	135,06
ABC	169,80	181,16	236,66	135,89
AC	170,58	156,65	221,58	137,06
LB	236,25	110,55	216,87	106,82
LBC	255,46	119,20	236,98	104,50
LC	237,48	97,47	196,92	100,77
RC	132,44	95,29	206,97	87,10
RBC	141,18	105,37	319,40	91,04

* Valores expressos em g/kg de matéria seca

4.2 Construção de microcosmos para avaliação de sucessão ecológica durante o processo de decomposição de material vegetal

Com o objetivo de avaliar a sucessão ecológica que ocorre durante a decomposição da matéria orgânica vegetal desde o instante em que esta se precipita nos sedimentos dos manguezais, foram construídos microcosmos destrutivos contendo 20g de sedimento, 8 discos de folhas das três espécies vegetais (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia recemosa* e *Avicennia schaueriana*) no

tamanho de 1,7 cm de diâmetro e 2 mL de água. Todo o material foi coletado diretamente dos manguezais e imediatamente acondicionado em frascos estéreis fechados com rolha de algodão, para evitar possíveis contaminações e também permitindo a troca de gases.

Os microambientes foram simulados em frascos de vidro tipo penicilina (50 ml), em triplicata e incubados a 24°C e acompanhados ao longo de 60 dias. Durante esse período foram avaliadas a estrutura das comunidades microbianas, as emissões de gases de efeito estufa e as taxas de decomposição da matéria orgânica, por meio de peso seco dos discos de material vegetal.

O peso seco dos discos vegetais coletados dos experimentos em microcosmos foi obtido pela medida da massa de matéria seca (MMS), depois de submetidos à secagem em estufa a 65-70 °C, até a obtenção de massa constante.

4.3 Efeito de diferentes fontes de matéria orgânica vegetal sobre a emissão de gases de efeito estufa (GEE) em tratamentos em microcosmo

Com o objetivo de avaliar se a degradação de diferentes fontes vegetais em sedimentos de manguezais com distintos estados de preservação afetam a emissão de gases do efeito estufa, foram feitas medições do ar encontrado sobre o sedimento que estava confinado em microcosmo.

As quantificações dos gases CO₂, CH₄ e N₂O foram feitas por meio de cromatografia gasosa nos tempos de 7, 15, 30 e 60 dias. As amostras de ar foram analisadas em uma única injeção de amostra, em cromatógrafo modelo SRI 8610C Gas Chromatograph, da empresa SRI *Instruments*. Essas quantificações foram feitas no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Campos Luiz de Queiroz- CENA USP (Piracicaba, SP), no prazo de até 5 horas desde o instante em que foram coletadas dos tratamentos em microcosmo.

4.4 Extração de DNA da superfície das amostras de material vegetal

Para a obtenção de ácidos nucleicos (DNA) do material celular encontrado sobre a superfície dos discos vegetais, foram empregados kits comerciais. A extração de DNA foi realizada utilizando o kit de extração de DNA Power Soil™ DNA Extraction Kit (MoBio), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA obtidos foram avaliadas em gel de agarose e analisadas em foto documentador.

4.5 Amplificação e quantificação do DNA do domínio bactéria das amostras de material vegetal por meio de PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada para quantificação do gene 16S de bactérias das amostras de solo. As reações se deram no equipamento StepOne *Real-Time* PCR System (Applied Biosystems), utilizando o kit Platinum[®] SYBR[®] Green (Invitrogen). As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 10 µL por reação, contendo 3,9 µL de água Milliq, 5 µL de PCR *buffer*, 0,05 µL de *forward primer*- 338F, 0,05 µL de *reverse primer*- 533R 1 µL do DNA total das amostras (MUYZER, 1993). A amplificação iniciou-se com a desnaturação a 94 °C/ 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94 °C/ 30 segundos; anelamento a 55 °C/ 30 segundos; e extensão a 72 °C/ 30 segundos, e ultima extensão a 72 °C/ 10 minutos. Para a curva padrão foram utilizadas as diluições 10^3 a 10^7 . Os dados para análise dos resultados foram obtidos por meio do StepOne *software* v 2.0.

4.6 Amplificação do DNA das comunidades de bactérias presentes nas amostras de material vegetal por meio de PCR (polymerase chain reaction)

Para realizar o sequenciamento em larga escala da região V6-V7 do gene 16S rRNA das amostras, utilizou-se o *forward primer* A-967F (SOGIN, et. al. 2006) e *reverse* 1195R (WANG et. al, 2009) e sequências de barcodes a extremidade 5' dos iniciadores. O *reverse primer* foi o mesmo para todas as bibliotecas. As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram amplificadas segundo protocolo de Sogin (2006). Para obtenção do Mix com um volume final de 25 µL, acrescentou-se 18 µL de água ultrapura (Milliq), 2,50 µL de *Buffer*, 2,50 µL de MgCl₂, 0,50 µL de dNTP's, 0,25 µL de *reverse primer* e 0,50 µL da Taq DNA polimerase. Em seguida foram adicionados 0,25 µL de barcode e 0,50 µL do DNA das amostras. A reação foi realizada em aparelho termociclador 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), programado para o ciclo de 94 °C por 5 minutos (desnaturação), seguido de 30 ciclos de 94 °C/ 30 segundos (desnaturação); 55 °C/ 30 segundos (anelamento); 72 °C/ 1minuto e 30 segundos (extensão), por fim a ocorreu a extensão final a 72 °C/ 5 minutos. Após a amplificação, a reação foi submetida a corrida em gel de agarose 1% e analisada em fotodocumentador.

4.7 Quantificação e purificação do produto de PCR

Nesse procedimento foram utilizadas as amostras de DNA obtidas a partir da técnica de PCR (item 3.6). A quantificação foi realizada no aparelho Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, *Life Technologies*), para obtenção de 1 μ L de DNA na concentração μ g/ μ L. Os resultados foram ajustado de acordo com a curva padrão Qubit[®] dsDNA HS Standard #1 e #2, adicionando 10 μ L em 190 μ L do mix (Qubit reagente-1 μ L/ Qubit *buffer*-199 μ L).

Após a quantificação das amostras, as mesmas foram purificadas no E-Gel[®] SizeSelect[™] 2% Agarose Gel (*Life Technologies*), utilizando-se como referência o marcador de 100 pb (pares de bases) DNA Ladder (100 a 1000 pb). Inicialmente foi feito um mix de 5 μ L de cada amostra de DNA e destas, 20 μ L foram depositadas nos poços do *E-Gel*, e ao final, os mesmos 20 μ L (amostra e água) foram coletados no tamanho entre 200/300 pb. Em seguida, foi feita a purificação em barra magnética adicionando-se 150 μ L de Agencourt[®] AMPure[®] XP Reagent em cada amostra coletada, seguida da adição de etanol 70% e 30 μ L de Low TE, seguindo o protocolo Ion Xpress[™] Plus gDNA *Fragment Library Preparation User Guide*.

4.8 Avaliação da Dinâmica da Comunidade Microbiana por Sequenciamento em Larga Escala

Com o objetivo de avaliar as alterações na diversidade microbiana nos tratamentos em microcosmo, foram realizados experimentos de sequenciamento em larga escala do gene que codifica o rRNA ribossomal do domínio Bacteria.

A plataforma utilizada para o sequenciamento foi a Ion Torrent, da Life Technologies. Essa plataforma permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 400 pb (pares de base). O sequenciamento foi realizado usando o instrumento Ion torrent PGM system.

Após extração de DNA conforme indicado anteriormente (item 3.4), foram utilizados *primers* para a amplificação dos genes que codificam o rRNA 16S do domínio Bacteria. As bibliotecas para sequenciamento em larga escala foram preparadas segundo o protocolo do fabricante (Life Technologies).

Para à confecção das bibliotecas individuais de cada amostra, foi feita a junção das mesmas, de forma a se obter um pool de fragmentos no qual todas as amostras foram unidas de forma equimolar, visando evitar ao máximo, a super-

representação de alguma delas. Em seguida foram realizadas as etapas de PCR em emulsão e enriquecimento.

Uma vez que as amostras são enriquecidas, é feita a adição dos reagentes para a reação de sequenciamento paralelo massivo. Para isso, utilizou-se o Ion Sequencing 400 Kit (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando o Ion 316™ Chip, e para cada grupo de 82 amostras foi realizada uma corrida de sequenciamento, o que totalizou 2 corridas.

O sequenciamento nessa plataforma ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH (potencial hidrogeniônico) da solução onde ocorre a reação de sequenciamento. Quando acontece a incorporação de uma base, uma molécula de hidrogênio é liberada, alterando assim o pH da solução. Essa pequena alteração gera um sinal que é identificado pelo software do equipamento (BARROS, 2012).

A aplicação desta metodologia permite a classificação taxonômica à nível de gênero em 73.5% das sequências de V6 com alta confiança (3.5% de erro). Além disso, a aplicação de softwares para agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), aumenta a resolução das comparações à nível de espécie em mais de 97% de similaridade.

4.9 Análises das sequências obtidas por meio de sequenciamento em larga escala

As sequências obtidas pelo sequenciador PGM Ion Torrent foram posteriormente processadas utilizando-se o *software* QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), seguindo o protocolo 454 Overview Tutorial, onde as amostras foram agrupadas em OTUs a nível de similaridade de 97% a partir dos “barcodes”. Através de comandos específicos foram retirados os *primers*, sequências de cloroplastos, mitocôndria e *singletons*. As *chimeras* foram identificadas através do *software* Mothur e retiradas em seguida, pelo comando *filter_fasta.py* por meio do programa QIIME, o que resultou em sequências de aproximadamente 200 a 230 pb. Dentro de cada OTU gerada, foram separadas as sequências representativas e realizadas as análises taxonômicas baseadas nas informações obtidas com essas sequências, utilizando o método *Uclust* e o banco de dados do *Greengenes*. A partir do comando *make_otu_table.py* foi gerada uma

tabela de OTUs e a construção de árvore filogenética foi gerada a partir do comando *rep_set.tre*.

Os gráficos de barras para classificação taxonômica foram gerados a partir do comando *summarize_taxa_through_plots.py*, sendo os dados utilizados a nível de filo e classe no presente trabalho. As análises de α e β diversidade e comparações entre as bibliotecas serão realizadas pelos softwares Mothur (SCHLOSS et al., 2009) e Qiime (CAPORASO et al., 2010).

4.10 Análises estáticas

As análises dos dados foram realizadas através da Análise de Variância (TWO-WAY ANOVA) para avaliar as diferenças entre os tratamentos, análise de coordenadas principais (PCoA) para visualizar a relação entre as amostras e também foi empregado o teste de análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), para verificar as diferenças entre os manguezais, espécie vegetal e o tempo de decomposição. Utilizou-se para as análises estatísticas o aplicativo PAST (HAMMER, Ø. et. al. 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Análise da massa de matéria seca (MMS) dos discos de material vegetal

Os resultados da avaliação da degradação do material vegetal demonstram que houve uma diferença significativa em relação ao tempo de degradação, não sendo observada uma influência do local ou planta (Figura 2 e Tabela 4). No entanto, os tratamentos com a planta *Avicennia schaueriana* no período de 60 dias foram completamente degradados nos três manguezais estudados, não sendo possível a quantificação da MMS sob essa condição. O mesmo ocorreu para a amostra LB 60 (Figura 2-A). A maioria dos demais tratamentos apresentou uma diminuição na MMS ao longo do tempo, como já era esperado, comprovando que o processo de decomposição estava ocorrendo nos experimentos em microcosmo.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) a dois critérios para avaliação da Massa de matéria seca (MMS) dos discos de folhas das plantas de mangue, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). Fator A: local e amostra, Fator B: tempo.

TWO-WAY ANOVA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Razão F	p-valor
Fator A:	0,00340809	8	0,000426011	1,079	0,3873
Fator B:	0,00417816	3	0,00139272	3,529	0,01905
Interação dos fatores:	0,0102696	24	0,000427899	1,084	0,3828

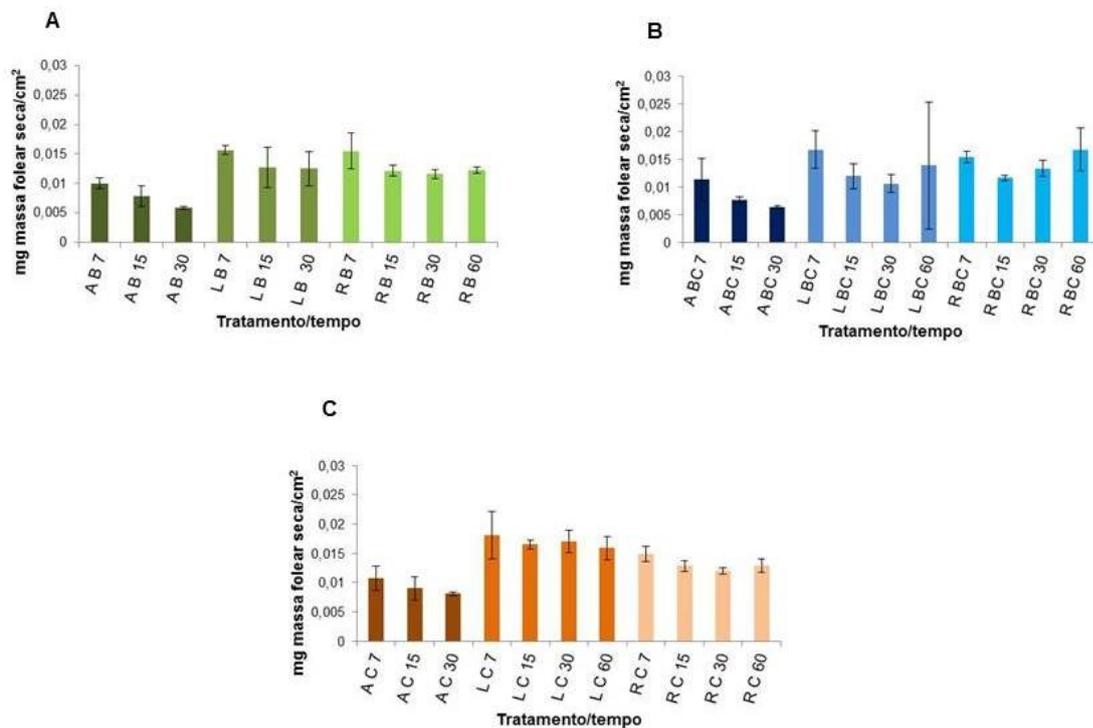


Figura 2 - Massa de matéria seca (MMS) dos discos de folhas das plantas de mangue nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias nos manguezais de Bertioiga (A), Bertioiga Contaminado (B) e Cananéia (C). AB - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioiga nos tempos 7,15 e 30 dias. ABC- *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioiga com contaminação nos tempos 7,15, e 30 dias. AC - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15 e 30 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioiga nos tempos 7,15 e 30 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioiga com contaminação nos tempos 7,15 e 30 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioiga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioiga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias.

5.2 Análises das emissões de gases de efeito estufa (GEE) em tratamentos em microcosmos

5.2.1 Quantificação das emissões de N₂O

A análise da quantificação das emissões do gás N₂O indica que foram percebidas diferenças significativas para o tempo, local e planta, sendo que o fator tempo foi o que mais influenciou a emissão desse gás (Tabela 5). Os tratamentos AB7 e LC15 foram os que apresentaram os maiores valores de emissão (Figura 3).

Picos de emissão de N₂O foram observados para as plantas *Avicennia schaueriana* e *Rhizophora mangle* nos estádios iniciais de decomposição (T7), porém verificou-se uma diminuição nessas emissões, conforme ocorreu o avanço

desse processo nos manguezais de Bertioga e Bertioga Contaminado. No manguezal de Cananéia as maiores quantidades de emissão foram encontradas no tempo de 15 dias para todos os tratamentos, sucedendo uma redução gradual após esse período (Figura 3).

Tabela 5 - Análise estatística TWO-WAY ANOVA (Análise de variância ANOVA a dois critérios) para emissão de N_2O nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). Fator A: local e amostra, Fator B: tempo.

TWO-WAY ANOVA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Razão F	p-valor
Fator A:	22956,9	11	2086,99	2,101	0,02724
Fator B:	49386,1	3	16462	16,57	9,38E-09
Interação dos fatores:	205185	33	6217,74	6,259	9,12E-13

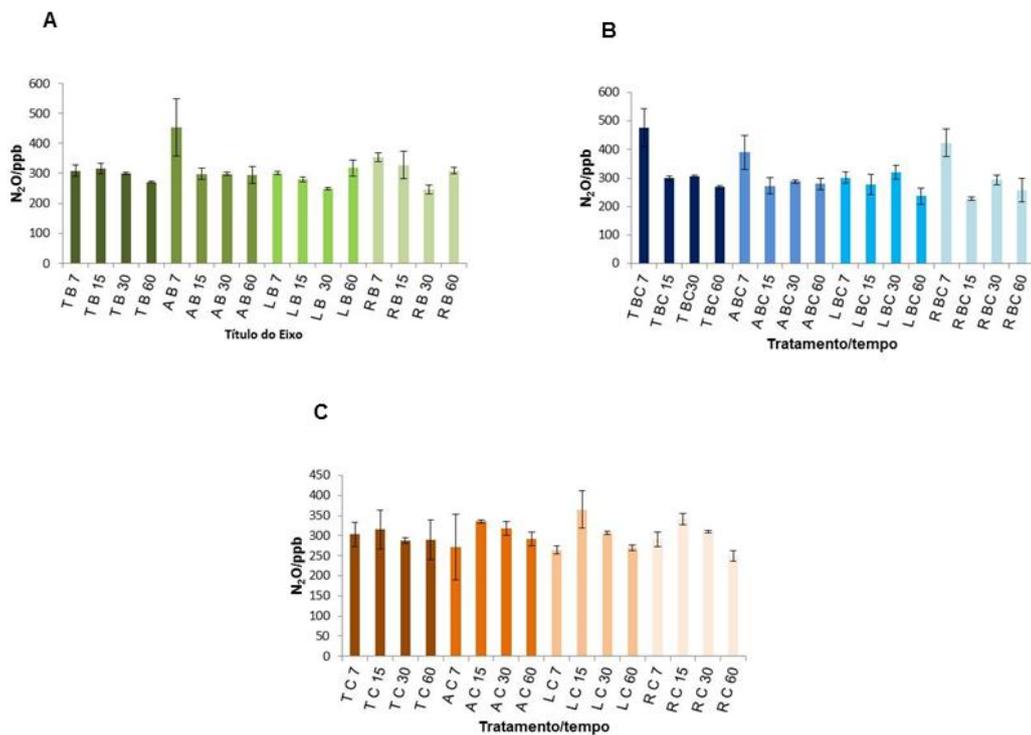


Figura 3 - Emissões de N_2O em partes por bilhão em experimentos de microcosmo nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). AB - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. ABC- *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga com

contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RC – *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias.

5.2.2 Quantificação das emissões de CO₂

Em relação à emissão de CO₂ tratamento e tempo foram considerados significativos, com o tempo tendo uma maior influência sob as taxas de emissão desse gás do que o local e as amostras (Tabela 6). O tratamento com a planta *Rhizophora mangle* exibiu taxas altas de emissão inicial tanto para o manguezal de Bertioga, quanto para Bertioga Contaminado (Figura 4). Os maiores valores foram obtidos no tempo de 7 dias, para os tratamentos AB7, RB7 e RBC7.

Os manguezais de Bertioga e Bertioga Contaminado apresentaram maior estabilidade em seus valores de emissão do que o manguezal de Cananéia. Exceto para as três amostras citadas acima, que no tempo de 7 dias apresentaram picos altos, os demais valores dentro destes dois locais foram bem homogêneos. Já o manguezal de Cananéia obteve resultados bem mais instáveis durante todo o processo de quantificação (Figura 4).

Tabela 6- Análise estatística TWO-WAY ANOVA (Análise de variância ANOVA a dois critérios) para emissão de CO₂ nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). Fator A: local e amostra, Fator B: tempo

TWO-WAY ANOVA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Razão F	p-valor
Fator A:	3,94E+06	11	358515	68,56	1,82E-40
Fator B:	1,93E+06	3	642959	122,9	9,24E-33
Interação dos fatores:	1,00E+07	33	303061	57,95	4,78E-50

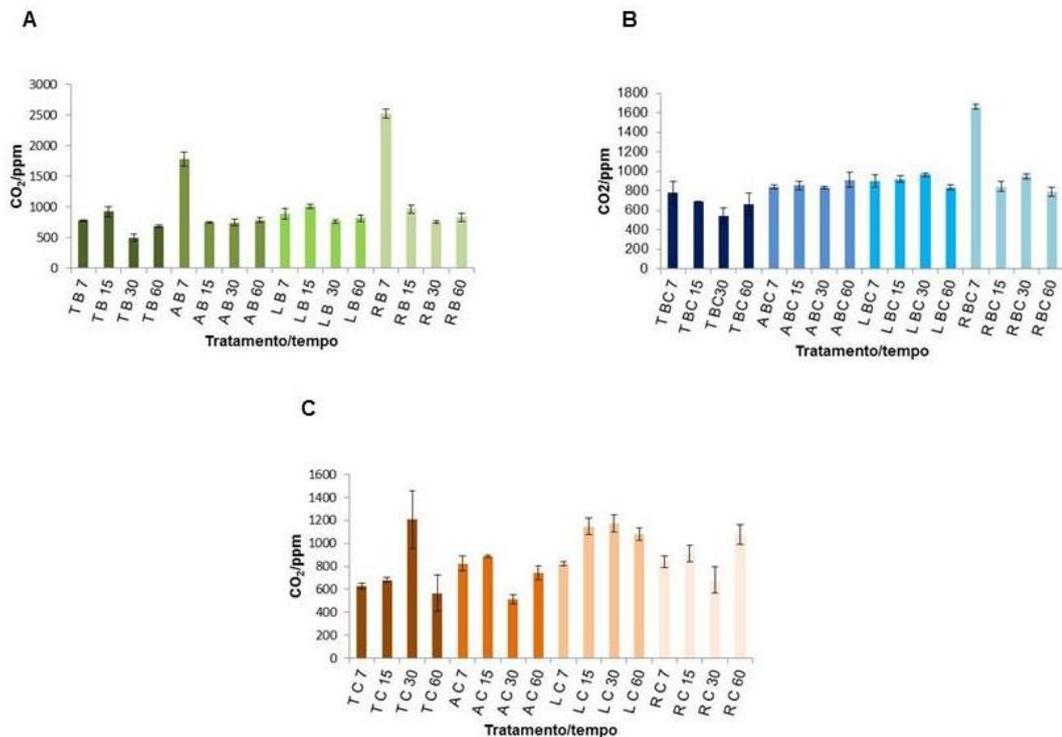


Figura 4 - Emissões de CO₂ em partes por bilhão em experimentos de microcosmo nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). AB - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. ABC- *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa* no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias.

5.2.3 Quantificação das emissões de CH₄

Para CH₄ somente o local foi considerado significativo (Tabela 7). Os manguezais de Bertioga e Bertioga Contaminado exibiram taxas de emissões mais homogêneas (Figura 5 A e B) entre seus tratamentos do que o manguezal de Cananéia, neste último as taxas de emissão foram bem menos uniformes do que nos demais. As amostras LC 30, LC 60, RC 30 e RC 60 apresentaram os maiores de emissão de gás metano.

Tabela 7 - Análise estatística TWO-WAY ANOVA (Análise de variância ANOVA a dois critérios) para emissão de CH₄ nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). Fator A: local e amostra, Fator B: tempo.

TWO-WAY ANOVA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Razão F	p-valor
Fator A:	6,25965	11	0,569059	3,659	0,00024
Fator B:	0,455879	3	0,15196	0,9771	0,4069
Interação dos fatores:	13,9778	33	0,423569	2,724	7,87E-05

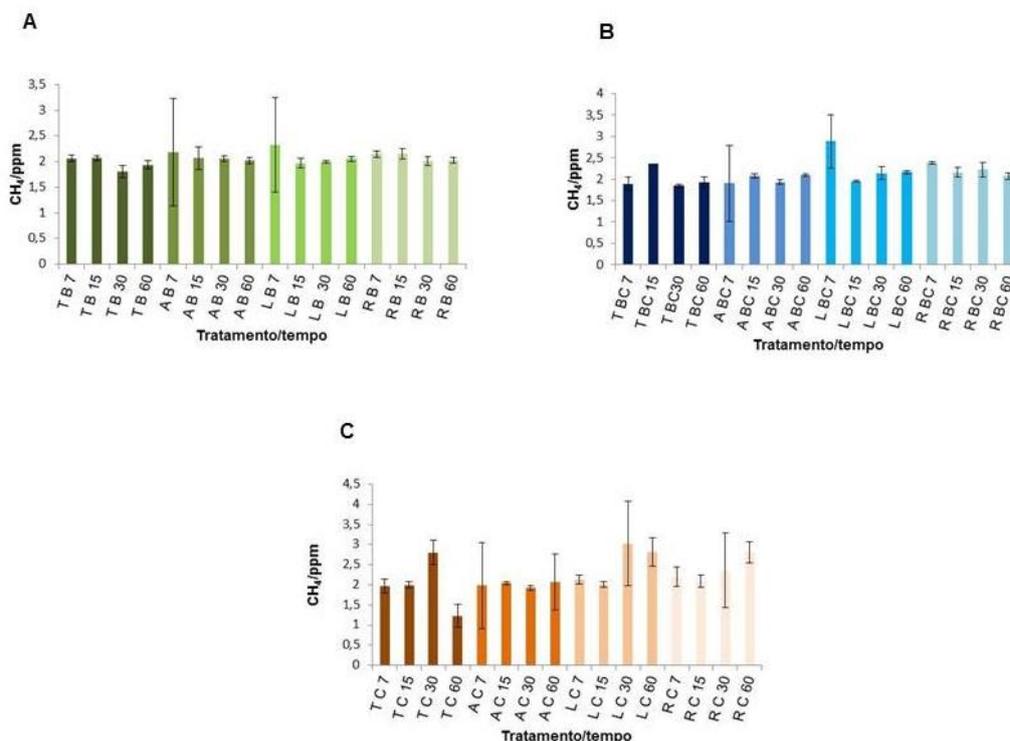


Figura 5 - Emissões de CH₄ em partes por milhão em experimentos de microcosmo nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). AB - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. ABC- *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias.

5.3 Quantificação de *rrs* (16S rRNA) por cm² de massa foliar dos discos de matéria vegetal por qPCR (PCR em tempo real)

Os resultados de qPCR indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, com os três manguezais e as três espécies de planta apresentando quantidades de *rrs* que não diferiram entre si ao longo do processo de decomposição.

Tabela 8 - Análise estatística TWO-WAY ANOVA (Análise de variância ANOVA a dois critérios) para quantificação de cópias de *rrs* por cm² de massa foliar dos discos de matéria vegetal das plantas de mangue por qPCR nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (BC) e Cananéia. Fator A: local e amostra, Fator B: tempo

TWO-WAY ANOVA					
	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Razão F	p-valor
Fator A:	4,24E+15	8	5,29E+14	0,7764	0,6247
Fator B:	9,25E+14	3	3,08E+14	0,4523	0,7164
Interação dos fatores:	1,24E+16	24	5,18E+14	0,759	0,7725

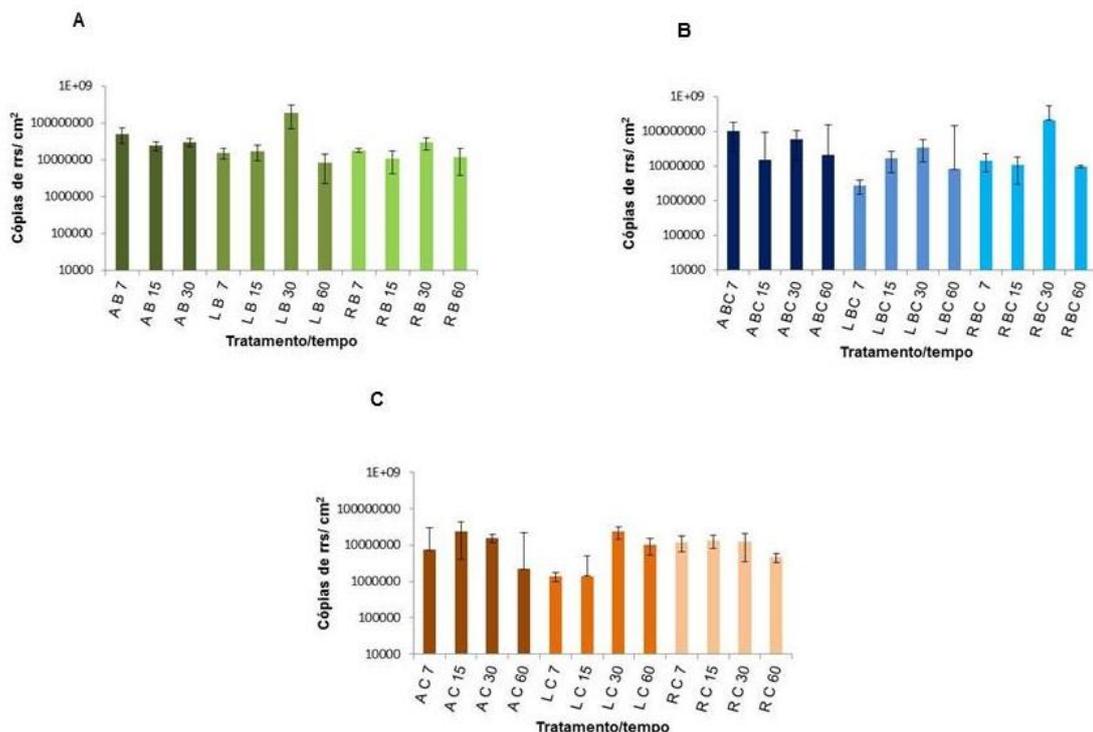


Figura 6 - Quantificação de cópias de *rrs* por cm² de massa foliar dos discos de matéria vegetal das plantas de mangue por qPCR nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (B) e Cananéia (C). AB - *Avicennia schaueriana*, no

manguezal de Bertioga nos tempos 7,15 e 30 dias. ABC- *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RC – *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias.

5.4 Estrutura das comunidades microbianas durante decomposição de material vegetal

A tabela 9 mostra o número de sequências e de OTUs em cada um dos tratamentos estudados durante os diferentes estádios de decomposição do material vegetal. Nela é possível perceber que para algumas amostras esses valores aumentaram ao longo do tempo, como no caso da planta *Aviccenia* no manguezal de Bertioga, enquanto que para outros tratamentos esses valores diminuíram, como no caso da planta *Aviccenia* no manguezal de Cananéia.

Tabela 9 - Número de sequências e OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) obtidas pelo sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA, observadas durante os estádios de decomposição do material vegetal, nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, nos manguezais de Bertioga (A), Bertioga Contaminado (BC) e Cananéia.

Manguezal	Tratamentos	nº de sequências*	nº de OTUs*	
Bertioga	A B 7	8430,67	1012,67	
	A B 15	12287,67	1983,33	
	A B 30	10388,33	2088,33	
	L B 7	14351,67	1781,67	
	L B 15	21885,00	2407,33	
	L B 30	13068,33	1931,33	
	L B 60	10128,00	1998,00	
	R B 7	9057,67	1768,00	
	R B 15	16562,33	2508,00	
	R B 30	7059,67	1484,33	
	R B 60	7968,67	2636,00	
	A BC 7	16110,00	1661,67	
	A BC 15	16757,67	2509,33	
	A BC 30	9789,33	1801,67	
A BC 60	7903,67	1710,33		
Bertioga Contaminado	L BC 7	12271,33	2555,33	
	L BC 15	35324,00	1829,00	
	L BC 30	34021,00	1983,33	
	L BC 60	7227,33	1609,00	
	R BC 7	13205,00	1771,67	
	R BC 15	16822,33	2047,67	
	R BC 30	21110,00	2486,33	
	R BC 60	5826,00	1957,33	
	Cananéia	A C 7	9796,67	1148,33
		A C 15	14897,67	1633,33
A C 30		14843,33	2053,33	
A C 60		3909,00	1052,00	
L C 7		31445,00	2911,33	
L C 15		21917,00	2143,67	
L C 30		16990,33	1825,00	
L C 60		11491,00	1403,67	
R C 7		25834,67	2000,33	
R C 15		26651,33	2292,00	
R C 30		13187,67	1812,67	
R C 60		9415,67	1652,67	

* Valores expressos em médias

AB - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15 e 30 dias. ABC- *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, e 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15 e 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15 e 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias.

5.4.1 Diversidade alfa (α) das comunidades de bactéria presentes nas amostras

A análise das sequências originou valores de alfa diversidade (PD - phylogenetic diversity) dos tratamentos (Figura 7). Segundo os resultados, todos os diferentes tratamentos apresentaram um aumento de diversidade ao longo do tempo, denotando assim uma maior diversidade nos estádios finais do processo de

decomposição de material vegetal. O tratamento RBC60 exibiu o maior valor, enquanto o tratamento RC7 apresentou o valor mais baixo.

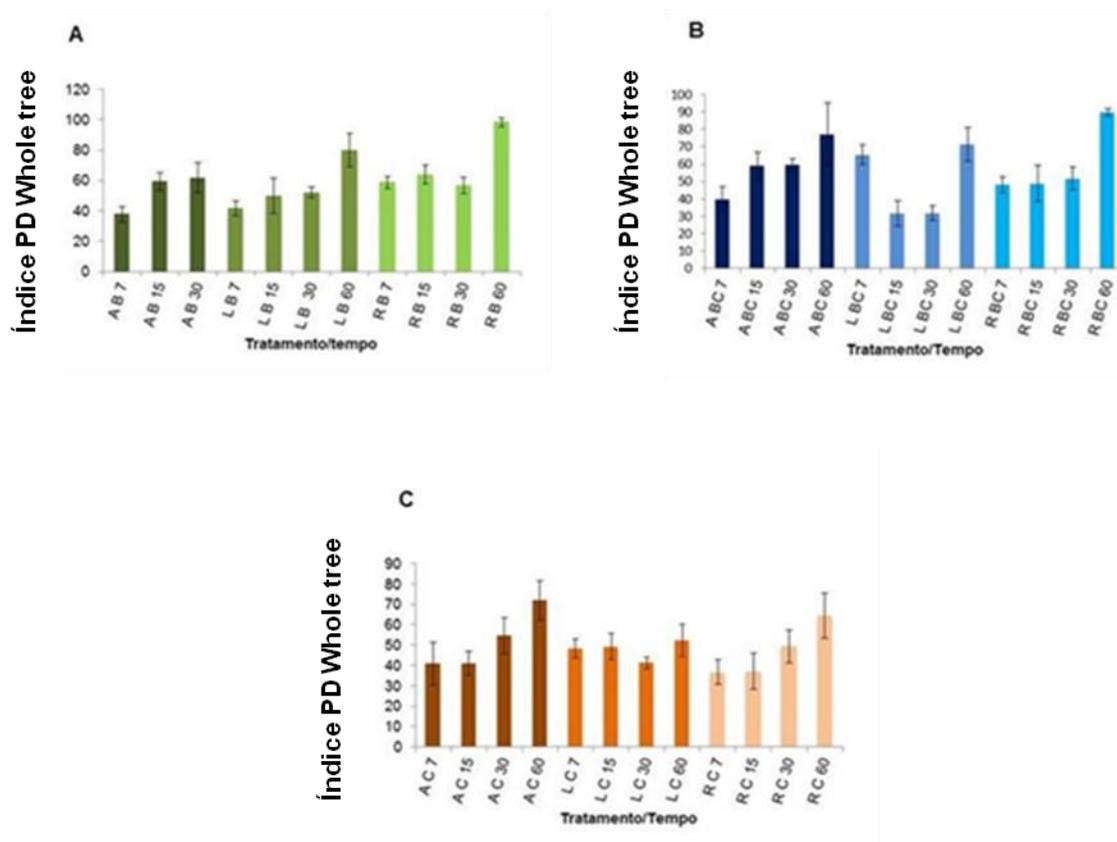


Figura 7 - Índice PD (phylogenetic diversity) nos manguezais de Bertioiga (A), Bertioiga Contaminado (B) e Cananéia (C). AB - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioiga nos tempos 7,15 e 30 dias. ABC- *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioiga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioiga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioiga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioiga nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioiga com contaminação nos tempos 7,15, 30 e 60 dias. RC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7,15, 30 e 60 dias.

5.4.2 Frequência relativa das sequências ribossomais das classes mais abundantes

Os resultados obtidos pelo sequenciamento em larga escala revelaram que a maioria das sequências obtidas pertence à classe Gammaproteobacteria, que foi a mais abundante independente da espécie vegetal ou manguezal analisado. Também é possível observar que essa classe ocorre em maior porcentagem no manguezal de

Cananéia (56,01%), em comparação com Bertioga (43,3%) e Bertioga Contaminado (50,1%). As demais classes mais representativas foram Alphaproteobactéria, Deltaproteobacteria, Clostridia, Flavobacteria, Bacteroidia, Epsilonproteobacteria, Actinobacteria e os grupos ainda não assinados.

Alguns grupos apresentaram redução na sua abundância durante os estádios finais do processo de decomposição do material vegetal (30 e 60 dias), sendo constatada uma diminuição bem acentuada, principalmente para a classe Gammaproteobacteria, com valores de redução de mais de 50% para algumas amostras.

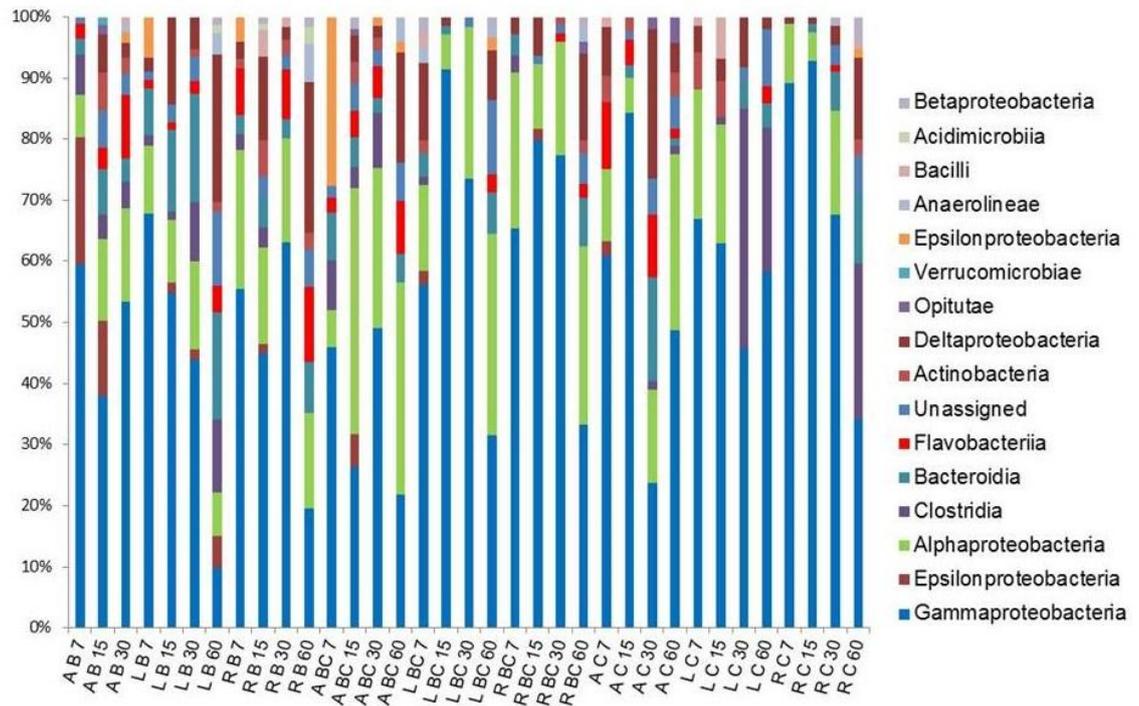


Figura 8 - Frequência relativa das sequências ribossomais das classes mais abundantes, acima de 1%, presentes em diferentes estádios de decomposição de material vegetal. AB - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15 e 30 dias. ABC- *Avicennia schaueriana* no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, e 30 e 60 dias. AC - *Avicennia schaueriana* no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15 e 30 e 60 dias. LB - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15 e 30 e 60 dias. LBC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. LC - *Laguncularia recemosa*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RB - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RBC - *Rhizophora mangle*, no manguezal de Bertioga com contaminação nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias. RC – *Rhizophora mangle*, no manguezal de Cananéia nos tempos 7, 15, 30 e 60 dias.

5.4.3 Diversidade beta (β).

As análises das sequências obtidas pelo sequenciamento em larga escala do gene rRNA 16S demonstraram que durante o processo de decomposição ocorreu uma sucessão entre os grupos de bactérias ao longo dos tempos analisados. Foram identificados grupos de micro-organismos dominantes em todas as etapas desse processo. Os organismos prevalentes nas etapas iniciais foram denominados como pioneiros (7 dias) e iniciais (15 dias). Já os que foram mais representativos nos estádios mais avançados de decomposição foram denominados intermediários (30 dias) e tardios (60 dias).

Para ser enquadrado dentro de uma das nomenclaturas propostas para as diferentes fases de decomposição, a abundância de determinada OTU de bactérias em um determinado estágio, deve exceder a sua soma em todos os demais estádios

(Figura 9). Aqueles grupos que não se enquadraram nos grupos acima mencionados, foram considerados generalistas.

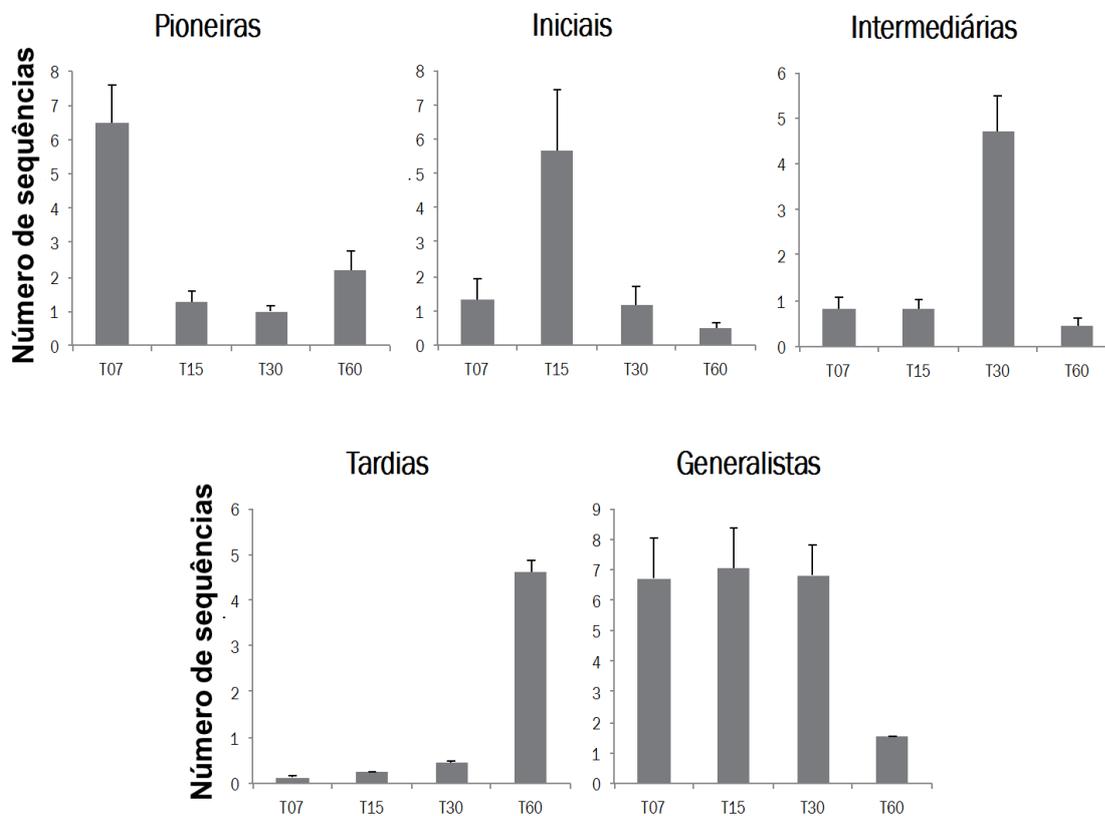


Figura 9 - Distribuição das classes mais abundantes, acima de 1%, presentes em diferentes estádios de decomposição de material vegetal nos manguezais de Bertioga, Bertioga Contaminado Cananéia. Pioneiras (7 dias), Iniciais (15 dias), Intermediárias (30 dias) e Tardias (60 dias)

Ao considerar a frequência das OTUs obtidas pelo sequenciamento em larga escala, percebe-se a predominância de determinados grupos durante os estádios de decomposição foliar (Figura 10). Em particular, a classe Gammaproteobacteria foi observada com maior frequência nos estádios iniciais de degradação. Já a classe Alphaproteobacteria teve a sua predominância acentuada nos estádios mais avançados.

Os resultados obtidos indicam que o processo de sucessão ecológica ocorreu durante a decomposição do material vegetal, onde foi possível perceber mudanças na estruturação das comunidades bacterianas ao longo do período estudado.

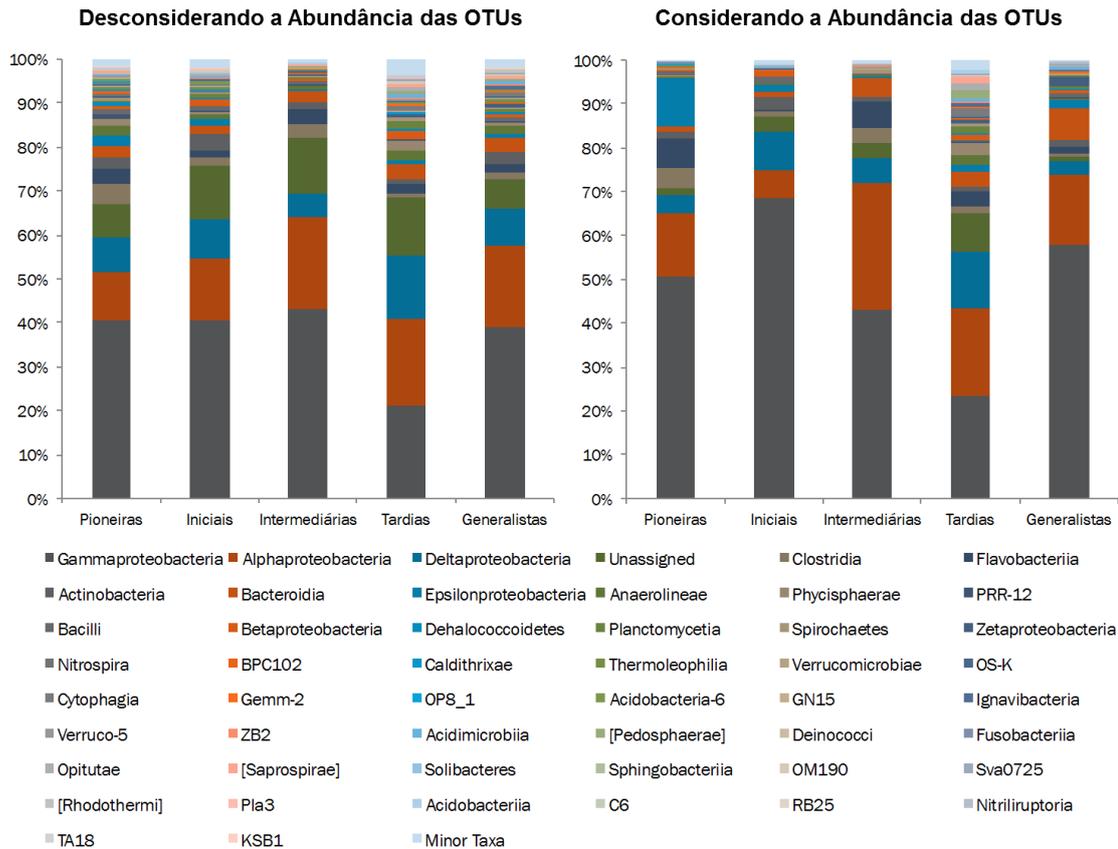


Figura 10 - Distribuição das classes identificadas em diferentes estádios de decomposição de material vegetal nos manguezais de Bertioga, Bertioga Contaminado e Cananéia. Pioneiras (7 dias), Iniciais (15 dias), Intermediárias (30 dias) e Tardias (60 dias).

A análise de PCoA (Análise de coordenadas principais) demonstrou uma variação no total de 21.12% do total das amostras, sendo que o eixo 1 apresentou 14.50% e o eixo 2 demonstrou 6.62% (Figura 11-A). É possível perceber que o manguezal de Bertioga foi o que exibiu um maior agrupamento dentro de suas amostras, sugerindo um possível nível de similaridade maior entre os grupos que compõe a comunidade deste local, como um todo (Figura 12-B).

Já nos manguezais de Bertioga Contaminado (Figura 12-C) e Cananéia (Figura 12-D) é possível observar um agrupamento das amostras em relação à espécie de planta. Os dados sugerem que espécies *Avicennia schaueriana* e *Rhizophora mangle* agrupam comunidades mais similares entre si, sendo possível observar uma importância do tempo de decomposição na determinação desse agrupamento.

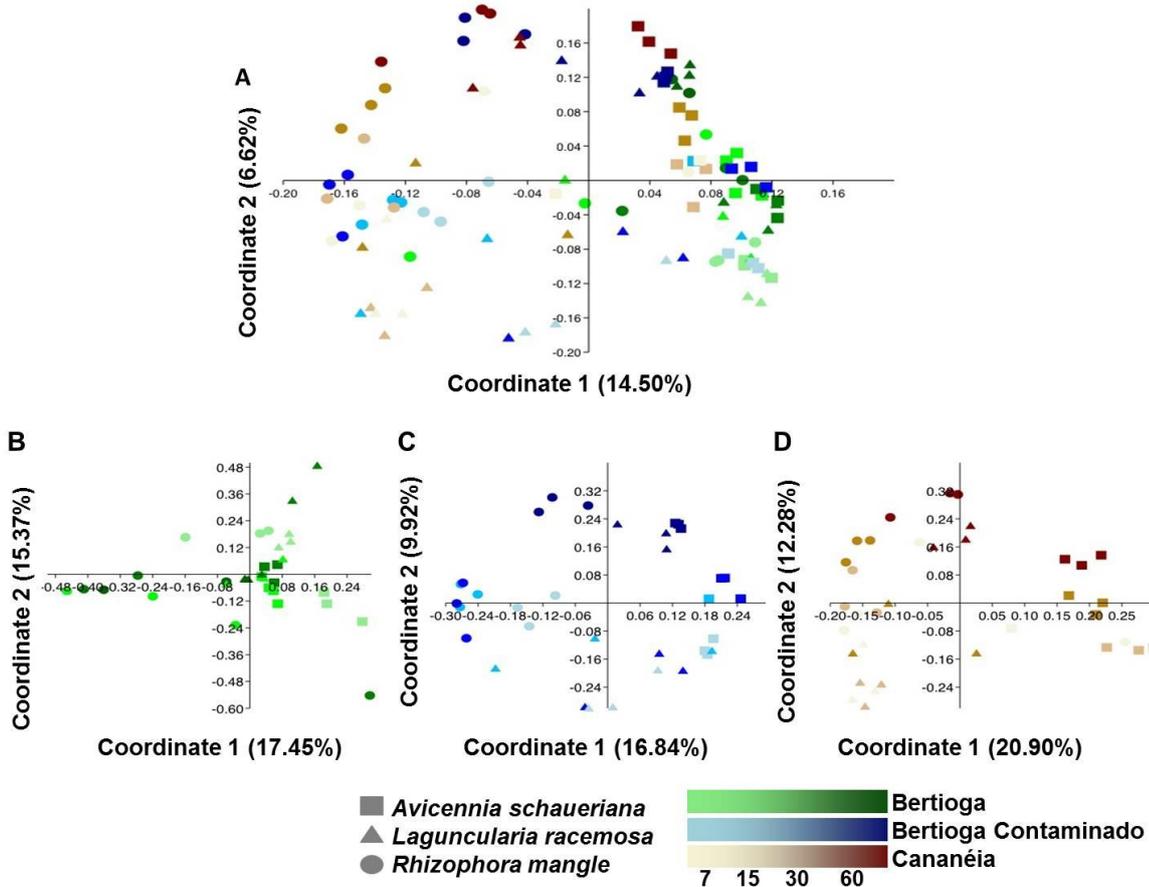


Figura 11 - Análise de coordenadas principais (PCoA) a partir dos resultados obtidos por sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA, dos grupos de bactérias presentes nas amostras de material foliar em diferentes estádios de decomposição, nos tempos: 7, 15, 30 e 60 dias. A – Considerando todas as amostras, B – Somente o manguezal de Bertioga, C – Somente o manguezal de Bertioga Contaminado e D – Somente o manguezal de Cananéia.

5.4.4 PERMANOVA

A análise PERMANOVA apontou diferenças significativas ($p > 0,05\%$) entre as OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) para todas as variáveis estudadas, exceto dentro dos tempos de decomposição de 15 e 30 dias. Esses resultados indicam que há uma menor diferenciação entre os grupos presentes nos estádios intermediários do processo de decomposição foliar.

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise da massa de matéria seca (MMS) dos discos de material vegetal

Dentro de um ecossistema manguezal, o material vegetal que cai no sedimento integra um longo reservatório de carbono, e representa uma energia em potencial disponível para a cadeia trófica desse ambiente. Aproximadamente de 30 a 50% da matéria orgânica em manguezais são lixiviáveis, sendo geralmente constituída por compostos que são solúveis em água, tais como taninos e açúcares. A fração remanescente da matéria orgânica contém polímeros estruturais da planta, também conhecidos como lignocelulose. Esse polímero é decomposto por bactérias e fungos, porém é indigesto para a maioria dos animais (BENNER; HODSON, 1985).

Estudos prévios realizados para avaliar a taxa de decomposição de folhas de plantas de mangue, indicam que as fases iniciais de degradação do material vegetal são extremamente importantes nesse processo. É nessa fase que sucede a retirada das substâncias mais lábeis, ocorrendo assim o incremento na quantidade de lignina, o que torna a porção remanescente mais recalcitrante ao processo de degradação (BENNER; HODSON, 1985).

Segundo Aké-Castillo et al. (2006), a decomposição de folhas ocorre ativamente nos dois primeiros meses e esse processo pode ser atribuído principalmente a ação de bactérias e fungos. Métodos para avaliar a degradação de material vegetal reproduzidos em experimentos em microcosmos, tais como os apresentados neste trabalho, são válidos, porém eles conseguem propiciar apenas uma visão superficial do que realmente está ocorrendo, pois o microhabitat e o microclima controlados podem ser bem diferentes dos encontrados em um ambiente natural.

Pinto (2010) avaliou a taxa de decomposição de *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* em manguezais de Santa Catarina, e a variação temporal foi o que mais influenciou a decomposição das duas espécies nos diferentes manguezais estudados, com diferenças significativas entre o início (7, 15, 30) e o final (60 a 120) dias do experimento.

Bomfim (2012) estudou o processo de degradação de *R. mangle* e *L. racemosa* em um manguezal da Bahia, e observou que o tipo de planta apresentou diferenças significativas no processo de decomposição. A planta *Rhizophora* obteve valores de decomposição maiores do que *Laguncularia racemosa*, demonstrando

que a composição química da planta pode influenciar se está será mais palatável ou não, aos organismos que estão agindo no processo de degradação.

Mendonça (2006) realizou experimentos para avaliar a decomposição de *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia*, e os resultados apontam que as três espécies vegetais estudadas se comportaram de maneira diferenciada. A planta *Avicennia germinans* apresentou a taxa mais acelerada, enquanto *R. mangle* teve a decomposição mais lenta. O autor argumenta que as taxas de nitrogênio e fósforo presentes em *A. germinans*, podem influenciar as preferências dos organismos decompositores em relação a essa espécie, acelerando este processo. Matos et al. (2007) também obtiveram resultados que sugerem uma maior degradabilidade de *A. germinans* em comparação com as demais espécies estudadas.

Segundo Adaime (1985) a velocidade de decomposição de material foliar em manguezais pode variar de acordo com diversos fatores, tais como o local onde estas folhas caem, o local para onde serão transportadas, a natureza e idade deste material e também a espécie de planta a ser decomposta. Portanto, todos esses fatores, juntamente com as variáveis ambientais encontradas nos manguezais, mais os grupos de organismos presentes no processo de degradação, influenciam as taxas de decomposição do material foliar, bem como a renovação de nutrientes dentro deste ecossistema.

6.2 Análises das emissões de gases de efeito estufa (GEE) em tratamentos em microcosmos

As emissões dos gases CO₂, CH₄ e N₂O ocasionam o efeito estufa e consequentemente contribuem para o aquecimento global (HAINES, 2001). Regiões costeiras como os manguezais vêm sendo citadas como possíveis colaboradoras para o aumento desses gases na atmosfera, porém os fluxos de CH₄ e N₂O ainda foram pouco caracterizados nesses ambientes quando comparados com a emissão de CO₂. Trabalhos realizados com o intuito de quantificar a emissão dos GEE em manguezais de diferentes países, relatam que o fluxo de emissão desses gases parece ser regulado pelas características do sedimento, e principalmente, está positivamente relacionado com a quantidade de carbono e nutrientes disponíveis (NEVISSON et al., 1995; BANGE et al., 1996; ALLEN et al., 2007; CHEN et al., 2010).

Regiões costeiras localizadas em latitudes baixas são fontes líquidas de liberação de CO₂ para a atmosfera, apresentando altas taxas de respiração e supersaturação de CO₂ dissolvido (ALONGUI et al., 1993; HOLGUIN et al., 1999; ALONGUI et al., 2014).

Chen et al. (2010) obtiveram resultados significativos para a emissão de CH₄ e N₂O em um manguezal do sul da China. Já em outro estudo realizado em um manguezal na Indonésia, o mesmo autor conclui que apesar do sedimento dessa área ser rico em fontes de carbono e nitrogênio, as emissões de GEE são baixas e podem ser consideradas insignificantes (CHEN et al., 2014).

Em um manguezal na região do Caribe, Konnerup et al. (2014) demonstraram que as emissões de GEE provenientes do sedimento foram significativas tanto para CH₄ quanto para N₂O. Contudo, foram observadas grandes variações entre as quantidades dessas emissões.

Diversos autores concluem que essas diferenças observadas nos resultados de emissão de GEE em manguezais em diferentes localidades reflete a alteração de fatores temporais e espaciais que estão influenciando as taxas de emissões dentro desse ecossistema. Isso provavelmente ocorre porque manguezais situam-se em áreas que são influenciadas por processos de variações diurnas e sazonais nas características de seu sedimento, entre outros fatores (KONNERUP et al., 2014; BARNES et al., 2006; ROMIGH et al., 2006; ALLEN et al., 2011).

Baixos fluxos de emissão de CO₂ e CH₄ foram observados em estudos realizados em manguezais. No entanto, mais trabalhos relacionados à quantificação da emissão de GEE em manguezais brasileiros precisam ser realizados, principalmente levando em consideração as variações sazonais. Esse atributo, juntamente com as propriedades do sedimento e a quantidade de matéria orgânica disponíveis, são fundamentais para inferir se determinado manguezal emite taxas significativas de gases de efeito estufa, contribuindo para o aumento da temperatura global.

6.3 Quantificação de *rrs* (16S rRNA) por cm² de massa foliar dos discos de matéria vegetal por qPCR (PCR em tempo real)

Nas últimas duas décadas as metodologias independentes de cultivo sofreram um grande avanço, e por meio de técnicas moleculares, vêm ocorrendo uma revolução no conhecimento da diversidade microbiana. Essas metodologias

vêm possibilitando a descrição de muitos grupos de micro-organismos, dentre eles, grupos de bactérias. Essas abordagens permitem que inferências mais precisas e abrangentes sejam realizadas, agregando maiores informações sobre a alfa diversidade e diversidade funcional de diversos ambientes (GHIZELINI et al., 2012).

Os resultados de quantificação do Domínio bactéria por meio de PCR quantitativo (qPCR) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos estudados. Não foi apontado incremento ou redução nas quantidades de *rns* em nenhuma das etapas de decomposição do material vegetal.

Esses resultados corroboram com os encontrados por Lima (2012), que realizou quantificação do gene rRNA 16S de bactérias nos manguezais de Bertioga, Bertioga contaminado e Cananéia e também não observou diferenças significativas no número de cópias desse gene entre os tratamentos. Todos os locais e pontos amostrados pela autora se apresentaram bastante homogêneos.

Já Lopez 2013 encontrou uma maior abundância de bactérias no manguezal de Bertioga Contaminado, em comparação com Bertioga e Cananéia. A autora levanta a hipótese de que a contaminação por petróleo que ocorreu nesse manguezal pode ter favorecido o desenvolvimento, e conseqüentemente, uma maior abundância de bactérias nessa área. Esses resultados reforçam os encontrados previamente por Taketani et al. 2009, que também observaram uma correlação positiva entre o efeito do óleo e a quantidade de bactérias nas mesmas áreas de estudo.

Apesar das variações na quantificação de bactérias observadas nos diferentes estudos realizados nessas áreas, é incontestável a importância das comunidades bacterianas dentro do sedimento desse ecossistema. Diversos trabalhos ressaltam a relevância dessas comunidades para o funcionamento desse habitat, seja atuando na decomposição de folhas e liberando nutrientes para as plantas, ou nos diversos ciclos biogeoquímicos das quais essas fazem parte.

6.4 Diversidade alfa (α) das comunidades de bactéria presentes nas amostras

O aumento da alfa diversidade observado nos estádios finais de decomposição foliar pode ser uma indicação de que mais espécies de bactérias estejam envolvidas nos estádios mais avançados desse processo. Nessas etapas, geralmente é observada uma maior recalcitrância do material vegetal, devido à

retirada da parte que é mais facilmente degradável, restando assim à porção foliar mais resistente.

O aumento da diversidade de espécies observado para a maioria das amostras no tempo de 60 dias pode estar relacionado com o declínio da abundância da classe Gammaproteobacteria nos estádios mais avançados de decomposição (Figura 8). Essa classe foi a predominante nos estádios iniciais da degradação foliar, porém teve um declínio bem acentuado nos tempos de decomposição de 60 dias para grande parte dos tratamentos. Nesse período também pôde ser observada uma maior ocorrência de alguns grupos minoritários.

Xu et al. 2013 também observaram aumento na diversidade de bactérias durante os estádios finais do processo de decomposição foliar em um curso d'água. O autor ressalta que uma possível explicação para essa ocorrência é a mudança nas propriedades químicas da folha durante os estádios avançados de degradação.

Lima et. al. 2012 estudou comunidades bacterianas nos mesmos manguezais de Bertioga, Bertioga Contaminado e Cananéia e observou que este último abriga maior riqueza e diversidades do que os demais, sugerindo que as alterações ambientais ocasionadas devido à contaminação na região de Bertioga, podem ter influenciado a redução da diversidade microbiana nesse ambiente.

Segundo Thompson et al. (2013) o alto nível de diversidade encontrado em manguezais é algo esperado, uma vez que nesse ambiente, múltiplas espécies podem executar funções similares, importantes para a manutenção desse habitat. Sendo assim, elas podem auxiliar na manutenção da estabilidade desse ecossistema mesmo durante perturbações ambientais.

Após a folhar cair e alcançar o sedimento, os micro-organismos crescem rapidamente nesse substrato, utilizando aqueles compostos que são mais facilmente degradados, tais como açúcares e aminoácidos. Os organismos que estão atuando nesse processo de decomposição são afetados pela qualidade da folha, juntamente com as condições ambientais. Com o avanço do processo de degradação, ocorrem mudanças na composição do material foliar, e conseqüentemente, as comunidades decompositoras também estão suscetíveis a sofrerem alterações em sua estruturação (XU et al., 20013).

6.5 Frequência relativa das sequências ribossomais das classes mais abundantes

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a dominância do filo Proteobacteria na decomposição de folhas em manguezais, corroborando com diversos estudos que mostram que tais organismos são muito importantes na dinâmica de diversos solos (WILL et al., 2010; NACKE et al., 2011; DIAS et al., 2012).

Este filo corresponde ao maior grupo bacteriano, com morfologia e metabolismo muito diversificados, incluindo micro-organismos que realizam fotossíntese, os heterotróficos e aqueles que são quimiolitotróficos. Devido a essa característica de abrigar uma elevada diversidade fisiológica, o filo Proteobacteria costuma ser predominante em ambientes que apresentem elevadas variações ambientais (ETEMA et al., 2009). Neste trabalho, as cinco classes que integram esse filo estiveram presentes na maioria das amostras (Figura 8).

Ao longo dos últimos anos, diversos trabalhos vêm estudando e ressaltando a importância de bactérias em manguezais ao redor do globo. Estes estudos vêm evidenciando a contribuição desses organismos para a manutenção dos processos ecológicos que estão acontecendo nesse ambiente. Com o avanço das técnicas independentes de cultivo, cada vez mais informações estão sendo geradas, possibilitando uma melhor compreensão da diversidade, função e estruturação dessas comunidades.

Ao estudar a estruturação de comunidades bacterianas durante degradação de material vegetal provenientes de um curso d'água, em experimentos em microcosmo, Xu et al. (2013) também identificaram o filo Proteobacteria como o mais abundante, com os estádios iniciais de degradação sendo dominados pelas classes Betaproteobacteria e/ou Gammaproteobacteria. Os autores também observaram um declínio desta última classe nos estádios finais de degradação, com Alphaproteobacteria se tornando predominante nessas condições.

No presente trabalho, os manguezais de Bertioga e Cananéia apresentaram quantidades de Alphaproteobactéria (12,4 e 13,2% respectivamente), inferiores à quantidade encontrada em Bertioga Contaminado (19%). Em trabalho desenvolvido nesses mesmos manguezais Lima (2012) encontrou resultados similares, com Bertioga abrigando as maiores quantidades dessa classe.

DeAngelis et al. (2013), estudaram a decomposição de serapilheira em uma floresta tropical e também observaram a predominância de Gammaproteobacteria nos estádios iniciais da decomposição (1-4 semanas). Os autores concluem que as fases iniciais desse processo são dominadas por grupos que têm crescimento relativamente rápido, conhecidos como estrategistas r, e que nos estádios mais avançados, pode ser observada a presença de grupos minoritários com uma maior frequência. O trabalho evidencia a importância dos grupos bacterianos estrategistas r em promoverem as rápidas taxas de decomposição de material vegetal em florestas tropicais.

Santos et al. (2011) realizaram estudos com sedimento de manguezais em microcosmos, utilizando tratamentos com e sem contaminação por hidrocarbonetos, e identificaram as classes Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria como as prevalentes antes e depois das simulações de derramamento de óleo. Porém, a abundância de diversas ordens dentro da classe Gammaproteobacteria diminuiu significativamente após o acréscimo de óleo nos tratamentos, indicando uma possível sensibilidade dos organismos presentes nesse grupo em relação à contaminação com poluentes derivados de petróleo.

Fernandes et al. (2014) conduziram experimentos para estudar a diversidade de bactérias em dois manguezais na Índia, com um local em estado preservado e outro sob influência de ação antrópica. Os resultados demonstraram uma maior abundância das classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria nos dois ambientes. Outras classes importantes observadas foram Actinobacteria e Alphaproteobacteria, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

Em análise de sedimento de manguezais contaminados com hidrocarboneto, Nunes (2006) também encontrou o filo Proteobacteria como o dominante, este que exibiu representantes das suas cinco classes em todos os tratamentos, com destaque para Gammaproteobacteria como a mais representativa. Em estudos prévios realizados por Andreote et al. (2012) e Santos et al. (2011), os autores também apontaram o predomínio do grupo Gammaproteobacteria em sedimentos de manguezais, tanto em ambientes preservados, quanto nos impactados.

Sedimentos de manguezais são ricos em carbono, e a ocorrência de grupos de bactérias metabolicamente versáteis nesses ambientes pode indicar uma contribuição destes grupos em processos importantes, como por exemplo, ciclo do nitrogênio e carbono. Grupos como Gammaproteobacteria que apresentam

crescimento relativamente rápido, geralmente são predominantes em estuários, e em habitats que apresentem elevada concentração de nutrientes (PINHASSI; BERMAN, 2003; GREER, 2010). Essa classe possui um grande número de espécies de bactérias desnitrificantes que realizam o processo de desnitrificação, uma das etapas do ciclo do nitrogênio que contribui para a liberação do gás N_2O na atmosfera (BRETTAR et al., 2002).

Dias et al. (2010) realizaram estudos sobre a diversidade de bactérias presentes no sedimento do manguezal da Cananéia, na Ilha do Cardoso, utilizando uma abordagem independente de cultivo. As sequências analisadas revelaram a ocorrência dos grupos Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Acidobacteria, enquanto os demais grupos representativos foram Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. No sedimento desse manguezal, Alphaproteobacteria foi o grupo dominante.

Gomes et al. (2008) estudaram a estruturação de comunidades bacterianas em sedimentos de um manguezal localizado no Rio de Janeiro, e concluíram que as pressões antropogênicas que afetam esse ambiente não interferem de forma significativa nos grupos dominantes. No entanto, essas pressões podem exercer uma interferência negativa nos grupos minoritários.

Ao avaliar a estrutura de comunidades de fungos e bactérias durante o processo de decomposição de folhas em um curso de água doce, Das et al. (2006) concluíram que o tipo e a qualidade do material vegetal foi o que menos comportou diferenças substanciais na estruturação das comunidades microbianas. Esse estudo sugere que o tempo de decomposição, juntamente com a exposição do material vegetal, têm mais influência nesse processo do que a composição química da folha e a espécie da planta. Isso sugere que os micro-organismos presentes na decomposição de folhas são organismos generalistas, capazes de explorar uma ampla gama de recursos, possuindo a habilidade de aproveitar bem todos os nutrientes disponíveis.

Diversos estudos vêm sugerindo que o ecossistema manguezal, por apresentar uma combinação única e bem característica de parâmetros ambientais variáveis e próprios, conduz a composição de comunidades microbianas bem específicas (LUVIZZOTO, 2013).

A decomposição foliar é um processo extremamente importante em diversos ambientes, e micro-organismos participam ativamente deste processo, possibilitando

a transformação e disponibilização de nutrientes dentro de um ecossistema. Por meio dos resultados obtidos com sequenciamento em larga escala, esse trabalho evidenciou que o filo Proteobacteria foi o dominante nos três manguezais estudados, com representantes das suas cinco classes em todos os tratamentos. Gammaproteobacteria foi a classe mais numerosa, principalmente nos estádios iniciais de degradação do material vegetal das três espécies de plantas. Também foi possível identificar grupos característicos e/ou predominantes em determinada fase da decomposição foliar. Os resultados obtidos indicaram que durante esse processo ocorre uma alteração na estruturação dessa comunidade, com grupos sendo mais abundantes nos estádios iniciais e outros nas fases mais avançadas.

7 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- Em relação à análise de decomposição do material vegetal pela MMS o tempo foi o fator que mais influenciou a decomposição das três espécies vegetais nos três manguezais estudados. Porém a planta *Avicennia schaueriana* foi completamente degradada nos três manguezais estudados, não sendo possível realizar a quantificação da MMS nessas condições.
- Para N_2O e CO_2 , tempo e local foram significativamente importantes para as emissões desses gases nos tratamentos em microcosmos, com os maiores picos de emissão sendo observados nos manguezais de Bertioga e Bertioga Contaminado, principalmente nos estádios iniciais de decomposição foliar. Já em relação às emissões de CH_4 , somente o local foi considerado relevante, com os maiores valores sendo observados no manguezal de Cananéia, nos estádios de degradação mais avançados.
- A alfa diversidade dos tratamentos aumentou ao longo do tempo, com todas as amostras exibindo valores maiores nos estádios finais do processo de decomposição foliar.
- Os resultados obtidos por meio de sequenciamento em larga escala do gene rRNA 16S apontam o filo Proteobactéria como o grupo dominante durante a decomposição de material vegetal nos três manguezais estudados, independente da espécie de planta. A classe Gammaproteobacteria foi a mais abundante em todos os tratamentos estudados, se apresentando em maiores quantidades nas fases iniciais, e sofrendo redução nas fases mais avançadas.
- Foi possível identificar grupos de bactérias predominantes nas diferentes fases de decomposição foliar ao longo do período estudado. Gammaproteobacteria foi uma classe que apresentou maior abundância nos estádios iniciais (7 e 15 dias), enquanto Alphaproteobacteria foi mais abundante nos estádios avançados de degradação (30 e 60 dias).

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, T.J.; GHOSH, S.; NAGESH, T.; SASMAL, D. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulfur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. **Aquacult**, Mohanpur, v. 239, p. 275-288, 2004.

ADAIME, R.R. **Produção do bosque de mangue da Gambôa Nóbrega (Cananéia, 25° lat. S - Brasil)**. 1985. 88 p. Tese (Doutorado em Oceanografia) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

AKÉ-CASTILLO, J.A.; VÁZQUEZ, G.; LÓPEZ-PORTILLO, J. Litterfall and decomposition of *Rhizophora mangle* L. in a coastal lagoon in the southern Gulf of Mexico. **Hydrobiologia**, Xalapa, v. 559, n. 1, p. 101-111, 2006.

ALLEN, D.; DALAL, R.C.; RENNENBERG, H.; SCHMIDT, S. Seasonal variation in nitrous oxide and methane emissions from subtropical estuary and coastal mangrove sediments. **Plant Biology**, Queensland, v.13, p.126-133, 2011.

ALLEN, D.E., DALAL, R.C., RENNENBERG, H.; MEYER, R.L., REEVES, S.; SCHMIDT, S. Spatial and temporal variation of nitrous oxide and methane flux between subtropical mangrove soil and the atmosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Denmark, v. 39, p. 622–631, 2007.

ALONGI, D.M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**. Townsville, v. 15, p. 59–79, 1985.

_____. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. **Hydrobiologia**, Amsterdam, v. 285, p. 19–32, 1994.

ALONGI, D.M.; BOTO, K.G.; TIRENDI, F. Effect of exported mangrove litter on bacterial productivity and dissolved organic carbon fluxes in adjacent tropical nearshore sediments. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 56, p. 133–144, 1989.

ALONGI, D.M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationship in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Townsville, v. 171, p. 201-223, 1993.

ALVES, J.R.P. **Manguezais: educar para proteger.**: Fundação de Estudos do Mar, Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. SEMADS, Rio de Janeiro, 2001. 97 p.

ANDREOTE, F.D.; JIMÉNEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DIN-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S. de. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. e38600, 2012.

BANGE, H.W. RAPSOMANIKIS S, ANDREAE, M.O. Nitrous oxide in coastal waters. 1996, **Global Biogeochem Cycles**, Ohio, v. 10, p. 197–207.

BANO, N.; NISA, M.U.; KHAN, N.; SALEEM, M.; HARRISON, P. J.; AHMED, S. I.; AZAM, F. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indus river delta, Pakistan. **Marine Ecology Progress Series Pakistan**, Karachi, v. 157, p. 1–12, 1997.

BARNES, J.; RAMESH, R.; PURVAJA, R.; RAJKUMAR, A.N.; KUMAR, B.S.; KRITHIKA, K.; RAVICHANDRAN, K.; UHER, G., UPSTILL-GODDARD, R. Tidal dynamics and rainfall control N₂O and CH₄ emissions from a pristine mangrove creek. **Geophysical Research Letters**. Newcastle v. 33, p. 1-6, 2006.

BARROS, B.D.F. **Definição do perfil de alterações das sequências dos genes *apc*, *ctnb1*, *wt1*, *wtx* e *plcg2* em tumores de wilms**. 2012. 98 p. Tese (Doutorado em Oncologia) - Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2012.

BENNER, R.; HODSON, R. E. Microbial degradation of the leachable and lignocellulosic components of leaves and wood from *Rhizophora mangle* in a tropical mangrove swamp. **Marine Ecology Progress Series**, Columbia, v. 23, p. 221-230, 1985.

BOMFIM, A.B. **Decomposição das folhas de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* em um manguezal de Ilhéus, Bahia**. 2010. 38 p. Tese (Doutorado em Botânica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Ilhéus, 2010.

BRETTAR, I.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M. G. *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Braunschweig, v. 52, n. 6, p. 2211-2217, 2002.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, C. MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J. YATSUNENKO, ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, Colorado, v. 7, p. 335–336, 2010.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WILLIAM, A.W.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J.N.; SMITH, G., KNIGHT, A. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, Colorado, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

CHEN, G.C.; ULUMUDDIN, Y.I.; PRAMUDJI, S.; CHEN, S.Y.; CHEN, B.; YE, Y.; DAN, Y.; ZHI, Y.M.; HUANG, H.; WANG, J.K. Rich soil carbon and nitrogen but low atmospheric greenhouse gas fluxes from North Sulawesi mangrove swamps in Indonesia. **Science of the Total Environment**, Fujian, v. 487, p. 91–96, 2014.

CHEN, G.C. TAM, N.F.Y. Summer fluxes of atmospheric greenhouse gases N₂O, CH₄ and CO₂ from mangrove soil in South China. **Science of the Total Environment**, Hong Kong, v. 408, p. 2761–2767, 2010.

CORREIA, M.E.F.; ANDRADE, A.G. Formação de serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Ed. Gênese, 1999. p. 227-243.

DAS, M.; ROYER, T.V.; LEFF, L.G. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. **Applied and Environmental Microbiology**, Kent, v. 73, n. 3, p. 756-767, 2007.

DAS, S.; DE, M.; GANGULY, D.; MAITI, T.K.; MUKHERJEE, A.; KUMAR, T.; KUMA, J.T. Depth integrated microbial community and physico-chemical properties in mangrove soil of Sundarban, India. **Advances in Microbiology**, Sundarbans, v. 2, p. 234-240, 2012.

DEANGELIS, K.M.; CHIVIAN, D.; FORTNEY, J.L.; ARKIN, A.P.; SIMMONS, B.; HAZEN, T.C.; SILVER, W.L. Changes in microbial dynamics during long-term decomposition in tropical forests. **Soil Biology and Biochemistry**, Berkeley, v. 66, p. 60-68, 2013.

DIAS, A.C.; ANDREOTE, F.D.; RIGONATO, J.; FIORE, M.F.; MELO, I.S.; ARAÚJO, W.L. The bacterial diversity in Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, São Paulo, v. 98, n. 4, p. 541-551. 2010.

DOS SANTOS, H.F.; CURY, J.C.; DO CARMO, F.L.; DOS SANTOS, A.L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J.D. PEIXOTO, R.S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLoS One**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 3, p. e16943, 2011.

ETTEMA, T.J.; ANDERSSON, S.G. The α -proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. **Royal Society Biology Letters**, London, v. 11, n. 12, p. 429–432, 2008.

FELLER, I.C.; SITNIK, M. **Mangrove ecology: a manual for a field course; a field manual focused on the biocomplexity on mangrove ecosystems**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1996. 21 p.

FERNANDES, S.O.; KIRCHMAN, D.L.; MICHOTEY, V.D.; BONIN, P.C.; LOKABHARATHI, P.A. Bacterial diversity in relatively pristine and anthropogenically-influenced mangrove ecosystems (Goa, India). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 1161-1171, 2014.

FIERER, N.A.; NEMERGUT, D.B.; KNIGHT, D.B.; JOSEPH, M. Craine e changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. **Research in Microbiology**, Colorado, v. 161, n. 8, p. 635-642, 2010.

FUHRMAN, J.A.; HAGSTRÖM, Å. Microbial ecology of the oceans. Bacterial and archaeal community structure and its patterns. In: KIRCHMAN, D. L. (Ed.). **Microbial ecology of the oceans**. Lewes, 2008. p. 45–90.

FUHRMAN, J.A.; JACOB, A.; DAVID, C; NEEDHAM, M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. **Nature Reviews Microbiology**, Los Angeles, v. 13, p. 1-13, 2015.

GHIZELINI, A.M.; SANTANA, L.C.; HAGLER, M.; MACRAE, A. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: a mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1242-1254, 2012.

GOMES, F.H. **Caracterização de solos de manguezais e de restinga no município de Ilhéus-Bahia**. 2002. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GOMES, N.C.M.; BORGES, L.R.; PARANHOS, R.; PINTO, F.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology**, Belo Horizonte, v. 66, n. 1, p. 96-109, 2008.

GOREAU, T.J.; DE MELLO, W.Z. Minimizing net greenhouse gas sources from mangrove and wetland soils. **Greenhouse Gas and Carbon Balances in Mangrove Coastal Ecosystems**, Tokyo, p. 239-248, 2007.

GREER, C.W. Bacterial diversity in hydrocarbon-polluted rivers, estuaries and sediments. In: TIMMIS, K.M. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. Montreal: Springer, 2010. p. 2329-2338.

HAINES, A.; HOUGHTON, J.T.; DING, Y.; GRIGGS, D.J.; NOGUER, M.; VAN DER WINDEN, P.J.; DAI, X. Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group 1 to the Third Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. **International Journal of Epidemiology**, Cambridge, v. 32, n. 2, p. 321-321, 2003.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Valencia, v. 4, p. 9, 2001.

HOLGUIN, G.; GUZMAN, M.A.; BASHAN, Y. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. **FEMS Microbiology Ecology** Mexico, v.101, p. 207–216, 1992.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, W. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Mexico, v. 33, p. 265–278, 2001.

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y.; MENDONZA-SALGADO, R.A.; AMADOR, E.; TOLEDO, G.; VAZQUEZ, P.; AMADOR, A. La microbiología de los manglares: bosques en la frontera entre el mar y la tierra. **Ciencia y Desarrollo**, Mexico, v. 144, p. 26-35, 1999.

HOLGUIN, G.; FLORES, A.; EBERHARD, A.; WINANS, S.; DÁVILA-LULE, A.; VILLICAÑA, C.; GERALDO, N.; BACILIO, M.; LÓPEZ DE LOS SANTOS, Y.; RUIZ, M. Microbiología de manglar y técnicas moleculares para su estudio. In: SÁNCHEZ, J. (Ed). **Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas**. Bogota: Universidad Nacional de Colombia, 2007. p. 94-103.

HAINES, A. Climate Change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group 1 to the Third Assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. **International Journal of Epidemiology**, Cambridge, v. 32, n. 2, p. 321-381, 2001.

KONNERUP, D.; PORTELA, J.M.B.; VILLAMIL, C.; PARRA, J.P. Nitrous oxide and methane emissions from the restored mangrove ecosystem of the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Santa Marta, v. 140, p. 43-51, 2014.

KRITHIKA, K.; PURVAJA, R.; RAMESH, R. Fluxes of methane and nitrous oxide from an Indian mangrove. **Current Science**, Chennai, v. 94, p. 218-224, 2008.

LAMBERTI, A. **Contribuição ao conhecimento da ecologia das plantas do manguezal de Itanhaém**. 1966. 217 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1966.

LEE, S.Y.; DUNN, R.J.K.; YOUNG, R.A.; CONNOLLY, R.M.; DALE, P.E.R.; DEHAYR, R.; LEMCKERT, C.J.; MCKINNON, S.; POWELL, B.; TEASDALE, P.R.; WELSH, D.T. Impact of urbanization on coastal wetland structure and function. **Austral Ecology**, Queensland, v. 31, p. 149-163, 2006.

LIMA, D.V. **Análise da diversidade, abundância e estrutura funcional da comunidade microbiana de três manguezais do Estado de São Paulo**. 2012. 206 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Ambiental) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LUGO, A.E. Mangrove understory: an expensive luxury? **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 2, p. 287-288, 1986.

LUVIZZOTO, D.M. **Transformação do nitrogênio e diversidade de Planctomycetes em sedimentos de manguezais**. 2013. 108 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MATOS, T.B.; BERNINI, E.M.; REZENDE, C.E. Decomposição de folhas de *Avicennia germinans*, *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* do manguezal do estuário do Rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 12., 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Associação Brasileira de Oceanografia, 2007. p. 13-26.

MENDONÇA, J.R.A. **Taxas de decomposição das folhas de *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia* no Furo Grande, Bragança-Pará.** 2006. 45 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas Costeiros e Estuarinos) Universidade Federal do Pará, Bragança, 2006.

MORAN, M.A.; HODSON, R.E. Formation and bacterial utilization of dissolved organic carbon derived from detrital lignocellulose. **Limnology and Oceanography, Wetlands**, v. 34, p. 1034–1047, 1989.

NASCIMENTO, S.A. **Ecofisiologia do manguezal.** Aracaju: Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos, 1998. 53 p.

NEDWELL, D.B.; BLACKBURN, T.H.; WIEBE, W.J. Dynamic nature of the turnover of organic carbon, nitrogen and sulphur in the sediments of a Jamaican mangrove forest. **Marine Ecology Progress Series**, Falmouth Harbour, v. 110, p. 223–231, 1994.

NEVISSON, C.D.; WEISS, R.F.; ERICKSSON III, D.J. Global oceanic emissions of nitrous oxide. **Journal of Geophysical Research**, Colorado, v. 100, p. 15809–15820, 1995.

NUNES, G.L. **Diversidade e estrutura de comunidades de bactéria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos de petróleo.** 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ODUM, W.E.; HEALD, E.J. Mangrove forests and aquatic productivity. In: HASLER, A.D. (Ed.). **Coupling of land and water systems.** Berlin; Heidelberg; New York: Springer, 1975. p. 129–136. (Ecological Studies).

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In: MARSHALL, K.C. **Advances in microbial ecology.** Indiana: Springer, 1986. p. 1–55.

PINHASSI, J.; BERMAN, T. Differential growth response of colony-forming α - and γ -proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. **Applied and Environmental Microbiology**, Tiberias, v. 69, n. 1, p. 199-211, 2003.

PINTO, M.D.O. **Decomposição de detritos vegetais de *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* nas áreas alagadas dos manguezais do Itacorubi e Ratoões-Florianópolis/SC.** 2010. 47 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

POLUNIN, N.V.C. Process in the decay of reed (*Phragmites australis*) litter in freshwater. In: GOPAL, B.; TURNER, R.E.; WETZEL, P.G.; WHIGHAM, D.F. (Ed.). **Wetlands: ecology and management**. Jaipur: National Institute of Ecology and International Scientific Public, 1982. p. 271-282.

ROJAS, A.; HOLGUIN, G.; GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-Fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-Solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. **Microbiology Ecology**, California Sur, v. 35, p. 181-187, 2001.

ROMIGH, M.M.; DAVIS, S.E.; RIVERA-MONROY, V.H.; TWILLEY, R.R. Flux of organic carbon in a riverine mangrove wetland in the Florida Coastal Everglades. **Hydrobiologia**, Louisiana, v. 569, p. 505-516, 2006.

SANTOS, H.; CURY J.C.; CARMO FL, SANTOS AL, TIEDJE J, VAN ELSAS JD, ROSADO AS, PEIXOTO RS. Contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLoS ONE**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 3, p. e16943, 2011.

SCHAEFFER-NOVELLI, I.; CINTRÓN-MOLERO, G.; ROTHLEDER ADAIME, R.; MARIA DE CAMARGO, T. Variability of mangrove ecosystems along the Brazilian Coast Estuaries. **Estuaries**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 204-218, 1990.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo: Caribbean Ecological Research, 1995. 12 p.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W. Introducing mother: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Michigan, v. 75, p. 7537–7541, 2009.

SCHULZ, H.D. Redox measurements in marine sediments. In: SCURING, J.; SCHULZ, H.D.; FISHER, W.R.; BOTTCHER, J. DUIJNISVELD, W.H.M. (Ed.). **Redox: fundamentals processes and applications**. Berlin Springer, 2000. chap. 19, p. 235-246.

SENGUPTA, A.; CHAUDHURI, S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. **Oecologia**, Bengal, v. 87, p. 560–564, 1991.

SOGIN, M.L.L.; HILARY, G. M.; HUBER, H.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

STEINKE, T.D.; BARNABAS, A.D. ;SOMARU, R. Structural changes and associated microbial activity accompanying decomposition of mangrove leaves in Mein Estuary. **South African Journal of Botany**, Durban, v. 56, p. 39–48, 1990.

STRALHER, A.N.; STRALHER, H.A. **Geografia física**. 3. ed. Barcelona: Omega, 2000. 550 p.

TAKETANI, R.G.; DOS SANTOS, H.F.; VAN ELSAS, J.D.; ROSADO, A.S. Characterization of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 96, n. 3, p. 343-354, 2009.

THATOI, H.; BEHERA, B.C.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, Odisha, v. 63, p. 1–19, 2003.

TOLEDO, G.; BASHAN, Y.; SOELDNER, A. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 11, p. 999-1011, 1995.

VANUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. Trad. de. D. Navas-Pererira. São Paulo: EDUSP, 1999. 233 p.

VARON-LOPEZ, M. **Descrição da microbiota relacionada às transformações do enxofre em sedimentos de manguezais**. 2013. 108 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, La Paz, v. 30, p. 460–468, 2000.

XU, W.; SHI, L.; CHAN, O.; LI, J.; CASPER, P.; ZOU, X. Assessing the effect of litter species on the dynamic of bacterial and fungal communities during leaf decomposition in microcosm by molecular techniques. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 460-468, 2013.

ZHOU, J. Predictive microbial ecology. **Microbial Biotechnology**, Norman, v. 2, p. 154–156, 2009.

ZHOU, J.; ZHILI, H.E.; YANG, Y.; SUSANNAH, Y.D.; TRINGE, G.; ALVAREZ-COHENC, L. High-throughput metagenomics technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. **Mbio**, Oklahoma, v. 6, p. 2288-2314, 2015.